

EDA ÇANDÖKEN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2008

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ALOE VERA (L.) BURM. FIL. (SARISABIR) EKSTRESİNİN
VE BU EKSTREDEN SAFLAŞTIRILAN LEKTİNİN
ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

EDA ÇANDÖKEN

**DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. NURTEN ÖZSOY**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

13 / 01 / 2009

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Biyokimya Anabilim Dalı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Eda ÇANDÖKEN
Tez Başlığı : Aloe Vera (L.) Burm. Fil. (Sarısabır) Ekstresinin ve Bu Ekstreden Saflaştırılan Lektinin Antioksidan Aktivitesinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 26 / 12 / 2008

Tez Sınav Jürisi

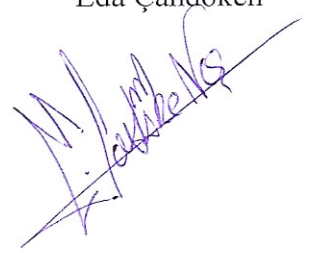
Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr. Ayşe CAN: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- 2.Prof.Dr. Nuriye AKEV: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- 3.Prof.Dr. Nurhayat SÜTLÜPİNAR: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı
- 4.Prof.Dr. İnci ÖZDEN: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- 5.Yard.Doç.Dr. Nurten ÖZSOY (Tez Danışmanı), İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Eda Candöken



İTHAF

*Bu tez çalışması bilgisine ve cesaretine hayran olduğum;
sabrını, adanmışlığını ve empatisini takdir ettiğim Sayın Yard. Doç. Dr. Nurten
ÖZSOY'a ithaf olunmuştur.*

TEŞEKKÜR

Düzenlenmesindeki yardımları, sabrı ve bu tez çalışmasının hazırlanmasında geçirilen zamanda her an desteğini ve teşviklerini gördüğüm danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Nurtan ÖZSOY'a minnettarım. Ayrıca gerek çalışmalarım sırasında, gerekse tezin yazımı sırasında büyük yardımlarını gördüğüm ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nuriye AKEV'e ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe CAN'a lisansüstü eğitimim süresince değerli önerileri ve teknik yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Sayın Arş.Gör. Mine ERGÜVEN'e, Sayın Arş.Gör. Özlem KURT'a, Sayın Arş.Gör. Tuğba YILMAZ'a ve Sayın Arş.Gör. Eda AKEL'e lisansüstü eğitimim süresince yardımcı önerileri ve teknik yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim görevlisi Sayın Yard. Doç. Dr. Erdal ÜZEN'e tez çalışmamda kullandığım bitkisel materyali İstanbul Üniversitesi Süleymaniye Botanik Bahçesi'nden edinmemde verdiği değerli destek için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde beni her konuda destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'ndan Sayın Uzman Biyolog Gökhan KÜLKÖYLÜOĞLU'na yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Çalışmalarımın yürütülmesi için gerekli maddi desteği sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, bugünümün yaşanmasında, kalplerini, emeklerini, pozitif enerjilerini benimle paylaşan, hayatım boyunca yanımda olan aileme ve dostlarıma varlıklarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-1456.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Oksijen ve Canlılar	4
2.1.1. Radikal Kavramı	4
2.1.1.1. Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow}$)	7
2.1.1.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)	7
2.1.1.3. Nitrik Oksit Radikali ($NO^{\bullet}$)	11
2.1.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	13
2.1.1.5. Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$).....	15
2.1.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri	17
2.1.2.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri.....	17
2.1.2.2. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri.....	18
2.1.3. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma (Antioksidan Savunma Sistemleri, Antioksidanlar)	19
2.2. <i>Aloe vera</i>	21
2.2.1. Botanik Özellikleri.....	21
2.2.2. Etimolojisi	22
2.2.3. Bileşimi	22
2.2.4. Kullanımı ve Etkileri.....	23
2.3. Lektinler	24

2.4. Affinite Kromatografisi	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Bitki Materyali.....	32
3.2. Kullanılan Gereçler.....	33
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	36
3.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	36
3.4.2. Ekstrenin Fenolik Bileşik ve Protein Miktar Tayininde Kullanılan Folin-Ciocalteu Ayırıcının Hazırlanması	37
3.4.3. Affinite Kromatografisinde Kullanılan Çözeltiler	37
3.4.4. Poliakrilamit Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	39
3.5. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpasının Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi	40
3.5.1. <i>A. vera</i> Yaprğından Pulpa ve Jel Ekstrelerinin Hazırlanması.....	40
3.5.2. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpası Ekstresinde Antioksidan Bileşiklerin Miktar Tayini ..	40
3.5.2.1. Askorbik Asit (C Vitamini) Miktar Tayini	40
3.5.2.2. Askorbik Asit Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	41
3.5.2.3. β -Karoten (Provitamin A) Miktar Tayini	42
3.5.2.4. α -Tokoferol (E Vitamini) Miktar Tayini.....	43
3.5.2.5. α -Tokoferol Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	43
3.5.2.6. Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini.....	44
3.5.2.7. Gallik Asit Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	44
3.5.2.8. Flavonoit Miktar Tayini.....	45
3.5.2.9. Kateşin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	45
3.5.3. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpası Ekstresinin Antioksidan Aktivitesinin Tayini.....	46
3.5.3.1. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpası Ekstresinin Demir (III) - Askorbik Asit ile İndüklenmiş Fosfatidilkolin Lipozomlarının Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisi	46
3.5.3.2. MDA Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	48
3.5.3.3. Troluks Ekivalan Antioksidan Kapasitesi (TEAC) Deneyi.....	48
3.5.3.4. Troluks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	50
3.5.3.5. DPPH Radikali Giderici Aktivitesi Tayini	50
3.5.3.6. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesi Tayini.....	51
3.5.3.7. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi.....	52

3.5.3.8. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	53
3.5.4. İstatiksel Değerlendirme.....	53
3.6. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpasından Lektin Elde Edilmesi	54
3.6.1. Ham Ekstrenin Hazırlanması.....	54
3.6.2. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpası Ham Ekstresinden Lektinin % 50 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi.....	54
3.6.3. % 4'lük Eritrosit Süspansyonunun Hazırlanması	54
3.6.4. Hemaglutinasyon Aktivitesi Tayini	55
3.6.5. Hemaglutinasyon Aktivitesinin Hesaplanması.....	56
3.6.6. Protein Miktar Tayini	57
3.6.7. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	57
3.6.8. Affinite Kromatografisi.....	58
3.6.8.1. Lektinin Özgül Karbohidrat Biriminin Belirlenmesi	58
3.6.8.2. Siyanojen Bromür (CNBr) ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B Jelinin Hazırlanması.....	59
3.6.8.3. Ligantın (Ovalbumin) Siyanojen Bromür ile Aktive Edilmiş Sefaroz 4B Jeline Bağlanması	60
3.6.8.4. Jelde Açıkta Kalan Aktif Grupların Bloke Edilmesi ve Jelin Yıkılması ...	60
3.6.8.5. Lektinin Jele Bağlanması ve Kolondan Elüsyonu	60
3.6.9. Poliakrilamit Jel Elektrofrez (PAGE)	61
3.6.9.1. Doğal Poliakrilamit Jel Elektrofrez (Native PAGE)	61
3.6.9.2. Sodyum Dodesil Sülfatlı Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	61
3.6.9.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	64
3.6.9.4. Jelin Yürütülmesi	64
3.6.9.5. Proteinlerin Jel Üzerinde Görünür Hale Getirilmesi - Jelin Boyanması	65
3.6.10. Molekül Ağırlığı Tayini	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. <i>A. vera</i> Ekstresinin Antioksidan Bileşiklerinin ve Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi	66
4.1.1. <i>A. vera</i> Ekstresinin Antioksidan Bileşiklerinin İncelenmesi.....	66
4.1.2. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpası Ekstresinin Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi.....	66
4.1.3. Troloks Ekvivalan Antioksidan Kapasitesinin (TEAC Deneyi) İncelenmesi	67

4.1.4. DPPH Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi.....	68
4.1.5. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi.....	68
4.1.6. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyelinin (FRAP Deneyi) İncelenmesi	68
4.2. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpasındaki Lektinin Saflaştırılma Evrelerindeki Protein Miktarları ve Hemaglutinasyon Aktivitelerinin İncelenmesi	77
4.3. Poliakrilamit Jel Elektrophorezi.....	78
5. TARTIŞMA	80
5.1. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpasının Antioksidan Aktivitesi.....	80
5.2. <i>A. vera</i> Yaprak Pulpası Lektini	83
5.3. Sonuç.....	86
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	98

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Çeşitli serbest radikaller - Halliwell (2006)'dan.....	6
Tablo 2-2: <i>Aloe</i> 'de bulunan bileşenler - Akev (2004)'den.	22
Tablo 2-3: Affinite kromatografisinde kullanılan bazı ligantlar.....	28
Tablo 3-1: Lektinin özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivitesi sonuçları.	59
Tablo 3-2: % 7,5'lik poliakrilamit jelinin hazırlanması.	61
Tablo 3-3: 0, 25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5'lik ayrıştırma jelinin hazırlanması.	63
Tablo 3-4: 0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5'lik sıkılaştırma jelinin hazırlanması.	63
Tablo 3-5: Marker olarak kullanılan düşük molekül ağırlıklı (LMW) proteinlerin Mr (Da) ve Rf değerleri.....	65
Tablo 4-1: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından hazırlanan sulu ekstrenin içerdiği total ekstre edilebilen madde miktarı (EC), askorbik asit, β -karoten, α -tokoferol, fenolik maddelerin (PC, yaprak ağırlığının her gramı için gallik asit ekivalanı olarak) ve flavonoit (yaprak ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı olarak) miktarları.	70
Tablo 4-2: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından hazırlanan sulu ekstrenin konsantrasyona bağlı olarak gösterdiği lipit peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri; ABTS ^{•+} , DPPH [•] ve süperoksit radikali giderici aktivitesi yüzdeleri; MDA, TEAC ve FRAP değerleri.	71
Tablo 4-3: α -Tokoferolün konsantrasyona bağlı olarak gösterdiği lipit peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri; ABTS ^{•+} ve DPPH [•] radikali giderici aktivitesi yüzdeleri; MDA, TEAC ve FRAP değerleri.	72
Tablo 4-4: Askorbik asidin konsantrasyona bağlı olarak gösterdiği ABTS ^{•+} , DPPH [•] ve süperoksit radikali giderici aktivitesi yüzdeleri; TEAC ve FRAP değerleri.	73
Tablo 4-5: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin EC ₅₀ , TEAC ve FRAP değeri olarak antioksidan aktivitesi.....	74
Tablo 4-6: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından lektin saflaştırılması evreleri.....	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Oksijen molekülü ve oksijen molekülünden meydana gelen bazı oksidan moleküllerin spin durumlarının şematik gösterimi - Halliwell ve Gutteridge (1984)'den.	5
Şekil 2-2: Mitokondriyal elektron transfer zinciri ve elektron kaçağı - Champe ve Harvey (1997)'den.	9
Şekil 2-3: Fagositik solunumsal patlama sırasında oluşan serbest radikaller ve reaksiyonları - Champe ve Harvey (1997)'den.	10
Şekil 2-4: Memeli hücrelerinde oksijen, nitrojen ve diğer reaktif türlerin üretimi - Fang ve arkadaşları (2002)'den.	12
Şekil 2-5: Reaktif oksijen türlerinin rejenerasyonu ve antioksidan savunma mekanizmaları - Mates ve arkadaşları (1999)'den.	14
Şekil 2-6: <i>A. vera</i> (L.) Burm. fil. (<i>A. barbadensis</i> Miller) - http://www.aloeverafarms.com (10.07.2008)'den.	21
Şekil 2-7: Affinite kromatografisi - Lehninger ve arkadaşları (1993)'den.	29
Şekil 2-8: Sefaroz-4B'nin yapısı.	30
Şekil 2-9: Affinite kromatografisinin prensibinin şematik gösterimi - Walsh (2007)'den.	30
Şekil 2-10: Agarozun siyanojen bromür ile aktivasyonu ve aktif agarozun amin gruplu ligantlar ile oluşturduğu ürünler (siyanat esteri, halkalı imidokarbonat, N-süstitue imidokarbonat, izoüre türevi) - Uslan (1988)'den (İçinde: Telefoncu 1988).	31
Şekil 3-1: <i>A. vera</i> yaprak enine kesiti ve sembolik görüntüsü - http://www.worth1000.com (11.07.2008)'den değiştirilerek.	32
Şekil 3-2: <i>A. vera</i> yaprağından jel kısmının ayrılması.	40
Şekil 3-3: DCIP boyasının indirgenmesi.	41
Şekil 3-4: Askorbik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi.	42
Şekil 3-5: α -Tokoferol standart eğrisi ve regresyon denklemi.	44
Şekil 3-6: Gallik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi.	45
Şekil 3-7: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi.	46
Şekil 3-8: MDA standart eğrisi ve regresyon denklemi.	48

Şekil 3-9: 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) amonyum tuzunun peroksidisülfatla oksidasyonu sonucu ABTS ^{•+} meydana gelişi - Huang ve arkadaşları (2005)'den.....	49
Şekil 3-10: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi.	50
Şekil 3-11: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH [•]) - Huang ve arkadaşları (2005)'den....	51
Şekil 3-12: Fe (III) tuzlarının [Fe (III) (TPTZ) ₂] ³⁺ , Fe (II)'ye [Fe (II) (TPTZ) ₂] ²⁺ indirgenmesi - Huang ve arkadaşları (2005)'den.....	52
Şekil 3-13: FeSO ₄ .7H ₂ O standart eğrisi ve regresyon denklemi.	53
Şekil 3-14: Mikrotitrasyon plaklarında hemaglutinasyonun gözle değerlendirilmesinin şematik gösterimi.	55
Şekil 3-15: Hemaglutinasyonun mikrotitrasyon plağında görünümü.	55
Şekil 3-16: Hemaglutinasyonun aydınlık saha (normal ışık) mikroskopunda lam - lamel arasındaki görünümü.	56
Şekil 3-17: Hemaglutinasyonun tüplerde görünümü.....	56
Şekil 3-18: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	58
Şekil 3-19: Vertikal (dikey) jel elektroforez cam plaka sisteminin hazırlanışı.	62
Şekil 3-20: Vertikal jel elektroforezi düzeneği - Lehninger ve arkadaşları (1993)'den. 64	
Şekil 4-1: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin TBA metoduna göre antioksidan aktivitesi.	75
Şekil 4-2: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi.	75
Şekil 4-3: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin DPPH radikali giderici aktivitesi.....	76
Şekil 4-4: <i>A. vera</i> yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin süperoksit radikali giderici aktivitesi.	76
Şekil 4-5: <i>A. vera</i> yaprak pulpası ham ekstresi % 50 amonyum sülfat kesitinin affinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği.	77
Şekil 4-6: <i>A. vera</i> yaprak pulpasındaki lektininin affinite kromatografisiyle elde edilen elüatın doğal poliakrilamit jel elektroforezindeki tek protein bandı.	78
Şekil 4-7: <i>A. vera</i> yaprak pulpası ham ekstresi ile bu ekstreden affinite kromatografisi ile elde edilen lektin elüatının, düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak çalışılan SDS-PAGE'deki protein bantları.....	78

Şekil 4-8: Düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerin SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemi.	79
Şekil 5-1: <i>A. vera</i> 'dan izole edilen bazı bileşiklerin kimyasal konfigürasyonları-Yagi ve arkadaşları (2002)'den.	81

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	: 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
ADP	: Adenozin difosfat
APS	: Amonyum peroksodisülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
ΔA	: Absorbans artışı
BHA	: Butil hidroksi anizol
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
Burm.	: Johannes Burman'nın botanik adlandırma sisteminde kullanılan özel yazar adı kısaltması.
Burm. fil.	: Nicolaas Laurens Burman, Johannes Burman'nın oğludur anlamında ikili adlandırma (binomial nomenklatür) sisteminde kullanılan özel yazar adı kısaltması. "fil." ise "oğul" anlamında "filius" kelimesinden türetilmiş bir kısaltma.
CAT	: Katalaz
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
DCIP	: 2, 6 - Diklorofenol - indofenol - sodyum
DG	: Dodesilgallat
DNA	: Dezoksiribonukleik asit
DPPH [•]	: DPPH radikali (2,2 - difenil - 1 - pikrilhidrazil)
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör (endothelium derived relaxing factor)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ER	: Endoplazmik retikulum
ETS	: Elektron taşıma sistemi (solunum zinciri)
EQ	: Etoksikuin
FAD	: Flavın adenin dinukleotit
FRAP	: Ferri iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli
GPx	: Glutasyon peroksidaz

GR	: Glutasyon redüktaz
GRAS	: Genellikle güvenli olarak kabul edilir (generally recognized as safe)
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSH - Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSH	: Okside glutasyon
HA	: Hemaglutinasyon
HMW	: Yüksek molekül ağırlıklı (high molecular weight)
8 - OHdG	: 8 - Hidroksi - 2' - deoksiguanozin
IR	: İyonize radyasyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
(L.)	: Carl Linnaeus'un (sonra Carl von Linné, Latince yazılı kitaplarda Carolus Linnaeus) canlıların latince ikili adlandırılma sisteminde kullanılan özel yazar adı kısaltması.
LMW	: Düşük molekül ağırlıklı (low molecular weight)
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NADH	: Nikotinamid adenin dinukleotit
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinukleotit fosfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik (phosphate buffered saline)
PG	: Propilgallat
RNA	: Ribonukleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
ROS	: Reactive oxygen species
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit

TBARS	: Tiyobarbitürük asit reaktif türleri (thiobarbiturate reactive substances)
TCA	: Trikloroasetik asit
TEAC	: Troloks ekivalan antioksidan kapasite
TEMED	: Tetrametiletilediamin
TEP	: 1,1,3,3, - Tetraetoksipropan
TNF- α	: Tümör nekrozis faktörü- alfa
TPTZ	: 2,4,6 - Tripiridil-s-triazin
Troloks	: 6 - Hidroksi - 2,5,7,8 - tetrametilkroman - 2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole
VAA	: <i>Viscum album</i> lektini (<i>Viscum album</i> agglutinin)
WGA	: <i>Triticum vulgaris</i> lektini (Wheat germ agglutinin)

ÖZET

Çandöken, E. (2008). Aloe vera (L.) Burm. fil. (Sarısabır) ekstresinin ve bu ekstreden saflaştırılan lektinin antioksidan aktivitesinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Uzun yıllardan beri “mucizevi bitki” olarak adlandırılan Aloe vera türünün laksatif, antienflamatuar, immunostimulan, antiseptik, yara ve yanık iyileştirici, antiülser, antitümör ve antidiabetik aktiviteleri bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Aloe'nin bu etkilerinin antioksidan etkisinden ileri gelebileceği düşünülebilir. Bu çalışmanın birinci bölümünde, bitkinin antioksidan potansiyelini değerlendirmek amacıyla Aloe vera yapraklarının pulpa ve jel kısımlarından hazırlanan sulu ekstraların antioksidan aktiviteleri, çeşitli antioksidan testler kullanılarak incelendi. Aloe vera yaprak pulpasında antioksidan aktiviteye sahip askorbik asit, beta-karoten, alfa-tokoferolün yanı sıra, fenolik ve flavonoid bileşikler bulunduğu saptandı. Aloe vera yaprak pulpasından hazırlanan sulu ekstrenin potansiyel antioksidan olarak demir ve askorbik asit ile indüklenmiş fosfatidilkolin lipozomlarının peroksidasyonunu inhibe ettiği, ABTS, DPPH ve süperoksit radikallerini giderdiği, indirgeyici güç gösterdiği ve doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı. Buna karşın, Aloe vera yaprak jelinden hazırlanan sulu ekstrenin DPPH radikali giderici aktivitesi değerlendirilerek antioksidan aktivite göstermediği sonucuna varıldı. Çalışmanın ikinci bölümünde Aloe vera yapraklarının pulpasından, amonyum sülfatla çöktürme ve ovalbumin bağlanmış siyanojen bromür ile aktive edilmiş Sefaroz 4B affinite kromatografisi ile tek bir lektinin saflaştırılması gerçekleştirildi. Lektinin molekül ağırlığını belirlemede ve saflaştırılmış proteinin saflık derecesinin tayininde doğal ve sodyum dodesil sülfatlı poliakrilamit jel elektroforezinden yararlanıldı. Doğal poliakrilamit jel elektroforezinde tek bant olarak ilerleyen lektinin, altbirim molekül ağırlığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezinde belirlendi. Bu lektinin DPPH radikali giderici aktivitesi değerlendirilerek antioksidan aktivite göstermediği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Aloe vera, yaprak ekstresi, antioksidan aktivite, lektin, affinite kromatografisi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-1456.

ABSTRACT

Çandöken, E. (2008). Comparative study on the antioxidant activities of the Aloe vera (L.) Burm. fil. (in Turkish Sarısabır) extract and the lectin purified from the leaf pulp extract. Istanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Master of Science Thesis, Istanbul.

Known for many years as miraculous plant, Aloe possesses many pharmaceutical activities, including laxative, antiinflammatory, immunostimulant, antiseptic, wound and burn healing, antiulcer, antitumor, and antidiabetic in which the mediation of the ROS levels could be involved. In order to evaluate the antioxidant potential of the plant, in the first part of this study, the antioxidant activities of the water extracts prepared separately from the pulp and gel parts of the plant leaves, were evaluated by using several antioxidant tests. The present study demonstrated that the water extract from Aloe leaves pulp contained naturally occurring antioxidant components, including ascorbic acid, beta-carotene, alpha-tocopherol, phenols and flavonoids. It was concluded that Aloe leaf pulp aqueous extract exhibited an inhibitory capacity against phosphatidylcholine liposome peroxidation, induced with iron and ascorbic acid, scavenged ABTS, DPPH and superoxide radicals and acted as reductant and thus can be used as natural antioxidant source in contrast, Aloe vera gel did not show any antioxidant activity as determined by DPPH radical scavenging test. In the second part of the study, a single lectin from the leaf pulp of Aloe vera was isolated by ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography on cyanogen bromide activated Sepharose 4B coupled to ovalbumin. Native and SDS polyacrylamide gel electrophoresis were used to determine the degree of purity of the lectin and the apparent molecular weight. The molecular weight of the subunits of the purified lectin, migrating as one band in native PAGE was determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The lectin did not show any antioxidant activity as determined by the DPPH radical scavenging test.

Key words: Aloe vera, leaf pulp, antioxidant activity, lectin, affinity chromatography.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.T-1456.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm diğer aerobik canlılar gibi, yaşamak için oksijene ihtiyaç duyan insanlar da, enerji gereksinimini, oksidatif metabolizma yani aerobik metabolizma tarafından kontrol edilen reaksiyonlar sonucu elde eder. Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak **reaktif oksijen türleri (ROT)** meydana gelmektedir (Mates ve ark. 1999). Mitokondriyal, endoplazmik ve nüklear elektron taşıma sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında ROT oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir (Anderson ve Phillips 1999). Oksijen radikallerinden etkilenebilecek başlıca vücut maddeleri arasında proteinler (enzimler ve kollajen), nörotransmitterler ve nükleik asitler sayılabilir. DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri de serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan ve **oksidatif stres** olarak adlandırılan kimyasal bir olaydır.

Serbest radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidatif savunma mekanizmaları; A vitamini, E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbik asit), β -karoten (Provitamin A), indirgenmiş glutatyon (GSH), doğal flavonoidler gibi non-enzimatik antioksidanlar ve çeşitli antioksidan enzimlerden oluşur (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999). En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen perokside dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT) ve organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px veya GPx)'dır. SOD, CAT ve GSH-Px, serbest oksijen radikallerine karşı önemli hücre içi enzimatik savunma sistemleridir (Aruoma 1998; Mates ve ark. 1999).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerin ve lipit peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın

oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Mates ve ark. 1999; Altan ve ark. 2006). Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır (King ve ark. 1998; Grover ve ark. 2003). Yapılan birçok çalışmada, deneysel olarak diabet oluşturulan sıçanlarda ve diabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Abou-Seif ve Youssef 2004). Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, vasküler komplikasyonlar (Cooper ve ark. 2001), katarakt (Özmen ve ark. 1997) ve nefropati (Ha ve Kim 1999) gibi diabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile ilgili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır.

Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü *in vivo* çalışmalar ile desteklenmiştir. Diabetik hastaların uzun süreli yüksek kan glukoz konsantrasyonlarına maruz kalmaları oksidatif stresi arttırabilir (Lee ve Chung 1999) ve bu durumda vücudun antioksidan savunma mekanizması yetersiz kalabilmektedir (Maxwell ve ark. 1997). Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosinin, oksidan maddeler meydana getirerek Langerhans adacıklarını seçimli olarak tahrip ettiği ve uygun olmayan nitrik oksit cevapları vererek diabeti başlattığı düşünülmektedir.

Diabette gerek insan plazmasında (Freitas ve ark. 1997), gerekse hayvan serumu ve dokularında (Özsoy ve ark. 2008) lipit peroksidasyonunun arttığı, yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür.

Diabette oluşabilen oksidatif stres yeni terapötik yaklaşımlara yol açmaktadır. Normal koşullarda vücut, doğal antioksidan sistemleriyle serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Antioksidanlar, vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik sonucunda gelişen oksidatif stresin, protein glikozilasyonunun ve glukoz metabolizmasının düzeltilmesinde önemli etkiler oluşturabilmektedir (Altan ve ark. 2006).

Son yıllarda doğal beslenmenin yanında bitkilerle tedavi de önem kazanmıştır. Bu amaçla halk arasında kullanılan bitkilerin biyokimyasal etkileri incelenerek bu kullanımlarının bilimsel dayanağı olup olmadığı araştırılmaktadır. Bitkilerin bazı hastalıkları iyileştirici etkilerinin doğal antioksidanlardan ileri geldiğine dair bilgiler

mevcuttur. Bu nedenle halk arasında yaygın olarak çeşitli amaçlarla kullanılan bitki ekstralarının antioksidan aktivitelerinin ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin yapılarının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Yüzyıllardır mucizevi bir bitki olarak adlandırılan *Aloe vera* bitkisi de bu bakımdan önem taşıyan bir kaynak oluşturmaktadır (Grindlay ve Reynolds 1986; Capasso ve ark. 1998).

Bu çalışmada, *A. vera*'nın daha önce bilimsel olarak kanıtlanmış biyokimyasal etkilerinin antioksidan etkisinden ileri gelebileceği düşünülerek, yapraklarının pulpa ve jel kısımları ayrılarak iki farklı ekstre hazırlanacak ve bu ekstraların askorbik asit, β -karoten, α -tokoferol, fenol, flavonoit gibi antioksidan etkili bileşiklerinin miktarları saptanacaktır. Daha sonra ekstraların antioksidan etkisi değişik antioksidan testlerle belirlenecektir.

Çalışmanın ikinci kısmında pulpadaki lektin, önce amonyum sülfatla çöktürülerek ayrılacak daha sonra şeker inhibisyon deneyleri ile lektine spesifik olan bir karbohidrat birimi bulunacak ve buna uygun affinite kromatografisi yöntemi geliştirilecektir. Bu yöntemle daha önce araştırmalarımızda hidroksilapatit kromatografisiyle ayrılmış olan Aloctin I'in saflaştırılması için daha ileri ve daha kolay bir yöntem geliştirilmiş olunacaktır.

Saflaştırılmış lektinin antioksidan etkisi yaprak pulpası ve jel ekstralarının antioksidan aktivitesi ile karşılaştırılmalı olarak incelenecektir.

Sonuç olarak, *A. vera* bitkisinin antioksidan etkisinin içerdiği lektinden ileri gelip gelmediği tartışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

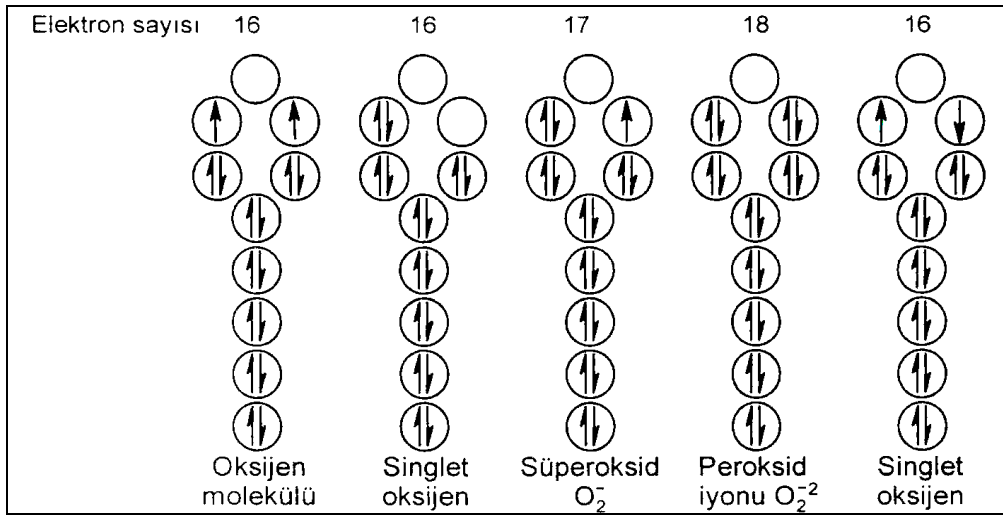
2.1. Oksijen ve Canlılar

Oksijen yaklaşık 2,2 milyar yıl önce atmosferimizde, fotosentetik canlıların faaliyeti sonucunda oluşmaya başlamıştır. Atmosferdeki oksijen birikiminin artması ile insanları UV radyasyonundan koruyan ozon tabakası oluşmuştur. Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Total oksijen tüketimimizin % 90'ından fazlasından elektron taşıma sistemi (ETS), % 5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Aerobik hücrelerin mitokondrilerinde meydana gelen moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve FADH₂'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür. Anaerobik canlılar ise büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler, sadece oksijensiz ortamda yaşayabilirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemesi ve bu reaktif türlere karşı anaerobik türlerde savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan yüksek yapılı canlılarda da toksik etkilidir. İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin **oksijen radikalleri** olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Kılınç ve Kılınç 2002; Halliwell 2006).

2.1.1. Radikal Kavramı

Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her orbitalde yerleşik iki elektron, birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir. Buna uygun olarak her bir orbitale bir tane aynı yönde dönen elektron yerleşmekte ve atom numarasına göre sayıları artan elektronlar tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde orbitale yerleşmektedir. Oksijen atomunun atom numarası olan 8, elektron sayısını vermektedir. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önem

taşımaktadır. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır. Orbitallerden birine veya ikisine ters dönüşlü bir veya ters dönüşlü iki elektron yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir. Halliwell ve Gutteridge (1984) oksijen molekülü ve oksijen molekülünden meydana gelen bazı oksidan moleküllerin spin durumlarının şematik gösterimini şekil halinde vermiştir (Şekil 2-1). Doğal oksijen molekülünden değişik sayıda oksidan molekül meydana gelmektedir (Halliwell 1989; Kılınç ve Kılınç 2002; Halliwell 2006).



Şekil 2-1: Oksijen molekülü ve oksijen molekülünden meydana gelen bazı oksidan moleküllerin spin durumlarının şematik gösterimi - Halliwell ve Gutteridge (1984)'den.

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir.

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R[•]), peroksit radikalleri, alkoksil radikalleri gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Halliwell (2006) çeşitli serbest radikalleri Tablo 2-1'de göstermiştir.

Tablo 2-1: Çeşitli serbest radikaller - Halliwell (2006)'dan.

Serbest Radikaller		Radikal Olmayan Reaktif Türleri	
Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Oksijen Türleri	
Singlet oksijen (O_2^1)		Ozon (O_3)	
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)		Hidrojen peroksit (H_2O_2)	
Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$)		Organik peroksitler ($ROOH$)	
Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)		Peroksinitrit ($ONOO^-$)	
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)		Peroksinitrik asit ($ONOOH$)	
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)		Peroksinitrat (O_2NOO^-)	
Karbonat radikali ($CO_3^{\bullet-}$)		Peroksomonokarbonat ($HOOCO_2^-$)	
Karbon dioksit radikali ($CO_2^{\bullet-}$)		Hipobromik asit ($HOBr$)	
		Hipoklorik asit ($HOCl$)	
Reaktif Klorür Türleri		Reaktif Klorür Türleri	
Klor radikali ($Cl^{\bullet}$)		Hipoklorik asit ($HOCl$)	Klor gazı (Cl_2)
		Nitril klorit (NO_2Cl)	Brom klorür ($BrCl$)
		Kloraminler	Klor dioksit (ClO_2)
Reaktif Brom Türleri		Reaktif Brom Türleri	
Brom radikali ($Br^{\bullet}$)		Hipobromik asit ($HOBr$)	
		Brom gazı (Br_2)	
		Brom klorür ($BrCl$)	
Reaktif Azot Türleri		Reaktif Azot Türleri	
Azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$)		Nitrik asit (HNO_2);	Peroksinitrat (O_2NOO^-)
Diazo trioksit ($N_2O_3^{\bullet}$)		Nitrosil katyonu (NO^+)	Peroksinitrik asit ($ONOOH$)
Nitrat radikali ($NO_3^{\bullet}$)		Nitrosil anyonu (NO^-)	Nitronyum katyonu (NO_2^+)
Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)		Dinitrojen tetra oksit (N_2O_4)	Alkil peroksinitritler ($ROONO$)
		Dinitrojen trioksit (N_2O_3)	Alkil peroksinitratlar (RO_2ONO)
		Peroksinitrit ($ONOO^-$)	Nitril klorit (NO_2Cl)
			Peroksiasetil nitrat [$CH_3C(O)OONO_2$]

Radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşurlar (Kılınç ve Kılınç 2002; Halliwell 2006).

1. Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşması. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur. Bazı araştırmacılara göre oksijen toksisitesi süperoksit radikalın oluşumuna bağlıdır.
2. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (450 - 600°C) şartlarında kovalent bağların kırılması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür yıkılmaya homolitik kırılma denir. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.
3. Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali ($GS^{\bullet}$) oluşur. İki tiyil radikalının birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999).

2.1.1.1. Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow}$)

Paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektronu bulunan moleküler oksijen serbest radikal tanımına göre, bir biradikal olarak değerlendirilir. Biradikal oksijenin elektronlarından birisinin enerji alarak spinini değişmesi ile **singlet oksijen** oluşur. Zıt spinli elektronlar aynı orbitalde (delta formu) veya ayrı ayrı orbitallerde (sigma formu) bulunabilirler. Singlet oksijen, paylaşılmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Enerji verilmek suretiyle meydana gelebilen oksijenin oldukça reaktif şekli olan singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır (Kılınç ve Kılınç 2002; Halliwell 2006).

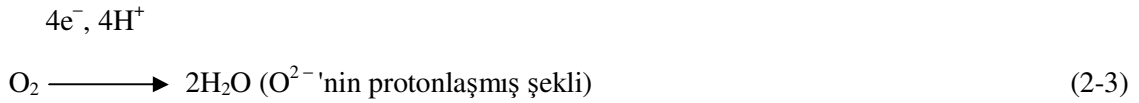
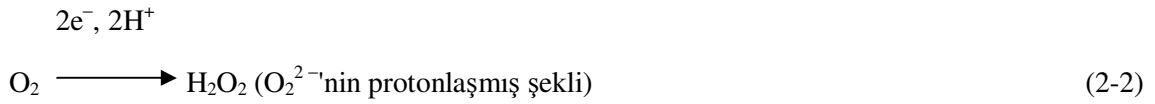
2.1.1.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Süperoksit radikali hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda oluşur (2-1) (Halliwell 1989).



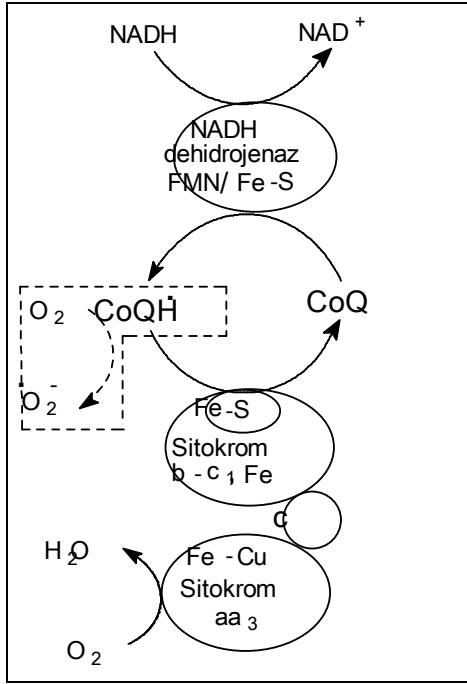
Süperoksit radikali başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
2. Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
3. Memeliler, hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondriyal elektron taşıma sisteminde, oksijenin dört elektronunun su (H_2O) oluşturmak üzere indirgenmesiyle elde ederler (2-2; 2-3) (Halliwell 2006).



Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijenin % 95'i suya indirgenirken % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır (Şekil 2-2). Oksijenin mitokondri solunumu sırasında bağlandığı ve suya indirgendiği sitokrom oksidaz basamağında radikal yapımı gösterilmemiştir. Sitokrom oksidaz Fe, Cu, Zn, Mg atomlarını 2: 2: 1: 1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Sitokrom oksidaz, içerdiği bu enzimatik aktivite sayesinde oluşan süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksiti hızla ortamdaki temizler (2-4) (Halliwell 1989; Kılınç ve Kılınç 2002; Halliwell 2006).

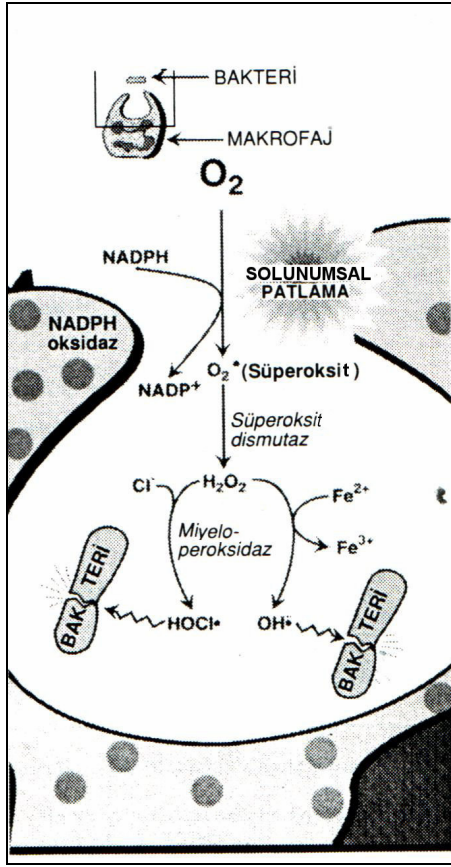




Şekil 2-2: Mitokondriyal elektron transfer zinciri ve elektron kaçağı - Champe ve Harvey (1997)'den.

4. Süperoksit radikali ve fagositik aktivite

Champe ve Harvey (1997 p.115) aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest radikallerin oluşumunu şekil halinde vermiştir (Şekil 2-3). İnfeksiyöz olaylarda başta *Staphylococcus aureus* gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatör maddeler nötrofil, eozinofil ve makrofajları aktive ederek membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla ROT salgılanmasına yol açarlar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır. Moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi sonucu NADP⁺ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur.



Şekil 2-3: Fagositik solunumsal patlama sırasında oluşan serbest radikaller ve reaksiyonları - Champe ve Harvey (1997)'den.

Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan NADP^{+} 'nin diğer kaynağı hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir.

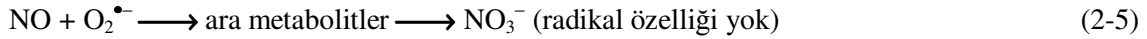
Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyel savunma mekanizması miyeloperoksidaz (MPO) enzimidir. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit varlığında klorür (Cl^-), iyodür (I^-) ve bromür (Br^-)'ün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit, hipoiyodik asit ve hipobromik asit oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler.

Aktive olan makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller, süperoksit anyonu üretirler. Süperoksit radikalinin dismutasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit miyeloperoksidaz

enzimi aracılığıyla, klorür iyonu ile reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipoklorik asidi oluşturur (Halliwell 1989).

5. Süperoksit radikali ve endotelyum

Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit ve nitrik oksit arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir. Süperoksit radikalının vazoregülasyonda fizyolojik rolüne ilişkin düşünceler de vardır. Vasküler endotelyum tarafından sentezlenen endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) vazodilatatör yanıtta sorumludur ve nitrik oksitle eşdeğerdir. Vasküler endotelyum aynı zamanda az miktarda süperoksit radikali sentez yeteneğine de sahiptir. Süperoksit radikalın nitrik oksit ile reaksiyonu sonucu bazı radikal olmayan ürünler meydana gelir (2-5).

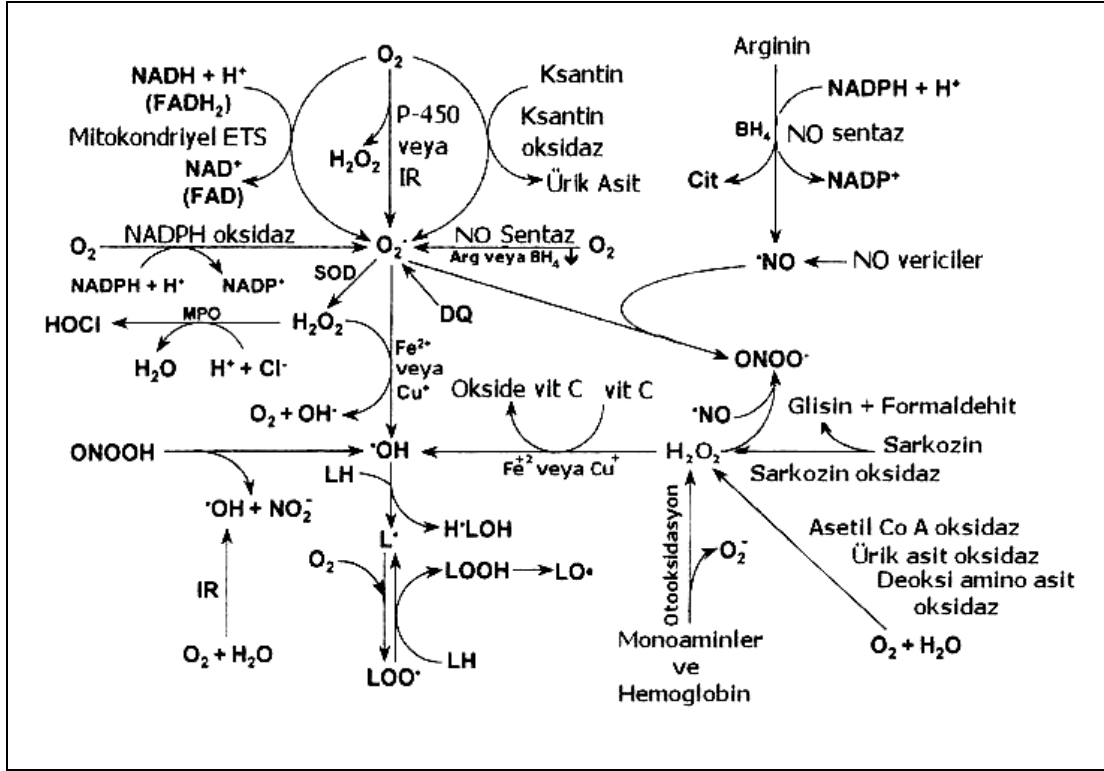


Vasküler endotelyum tarafından üretilen NO ve süperoksit radikali etkileşiminin vasküler tonüs düzenlenmesi ve kan basıncı üzerine yararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Halliwell 1989; Aruoma 1998). Bu gösteriyor ki vücudumuzda üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve "kötü" kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için, reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Oksijen radikalleri gibi, nitrik oksit radikalının yapımı da vazgeçilmez bir biyolojik olaydır (Kılınç ve Kılınç 2002).

2.1.1.3. Nitrik Oksit Radikali (NO[•])

Nitrik oksit, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir sinyal molekülü olduğu gibi aynı zamanda çok reaktif bir radikaldir. Nitrik oksit bir adet paylaşılmamış elektrona sahiptir ve bu nedenle ROT olarak kabul edilebilir. Fang ve arkadaşları (2002) yarı ömrü çok kısa olan (10-20 sn) lipofilik özellikteki bu serbest radikalın damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlendiğini şekil halinde vermiştir (Şekil 2-4). Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır. nNOS ve eNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki nitrik oksit (NO) sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci moleköl olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini artırır.

cGMP ise çeşitli enzimler aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar.



Şekil 2-4: Memeli hücrelerinde oksijen, nitrojen ve diğer reaktif türlerin üretimi - Fang ve arkadaşları (2002)'den.

IR: İyonize radyasyon; P-450: sitokrom P-450; ETS: Elektron taşıma sistemi (solunum zinciri); MPO: Miyeloperoksidaz; LH: Lipit (doymamış yağ asidi); L•: Lipit radikali; H•LOH: Hidroksi lipit radikali; LOOH: Lipit hidroperoksit; LO•: Lipit alkoksil radikali; LOO•: Lipit peroksil radikali; BH₄: Tetrahidriyopter, HOCL: Hipoklorik asit; ONOO⁻: Peroksinitrit.

Nitrik oksit sentazların indüklenebilir (iNOS) formu ise başta fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir. iNOS enziminin aktivitesi kalsiyumdan bağımsız olup kontrol edilemediğinden, ortamda arginin bulunduğu sürece aktif olup, uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizler. Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipit radikaller (L•) ile (örneğin hücre zarında) tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır. Nitrik oksidin süperoksit dismutaz enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit oluşur. Böylece nitrik oksidin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Nitrik oksidin toksisitesinden

sorumlu olan peroksinitrit, hidroksil radikalının potansiyeline sahiptir ve azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$), hidroksil radikali, nitronyum katyonu gibi toksik ürünlere dönüşebilir. Nitrik oksit radikalının stabil son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'tır. Fizyolojik (düşük) derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür. Nitrik oksit Fe-S proteinlerindeki demirin yerine kendisini bağlayarak Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogenezde rol oynar (Fang ve ark. 2002).

2.1.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz. Hidrojen peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması (2-6) veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması (2-7) sonucu oluşan peroksidin iki proton ile birleşmesi sonucu meydana gelir.

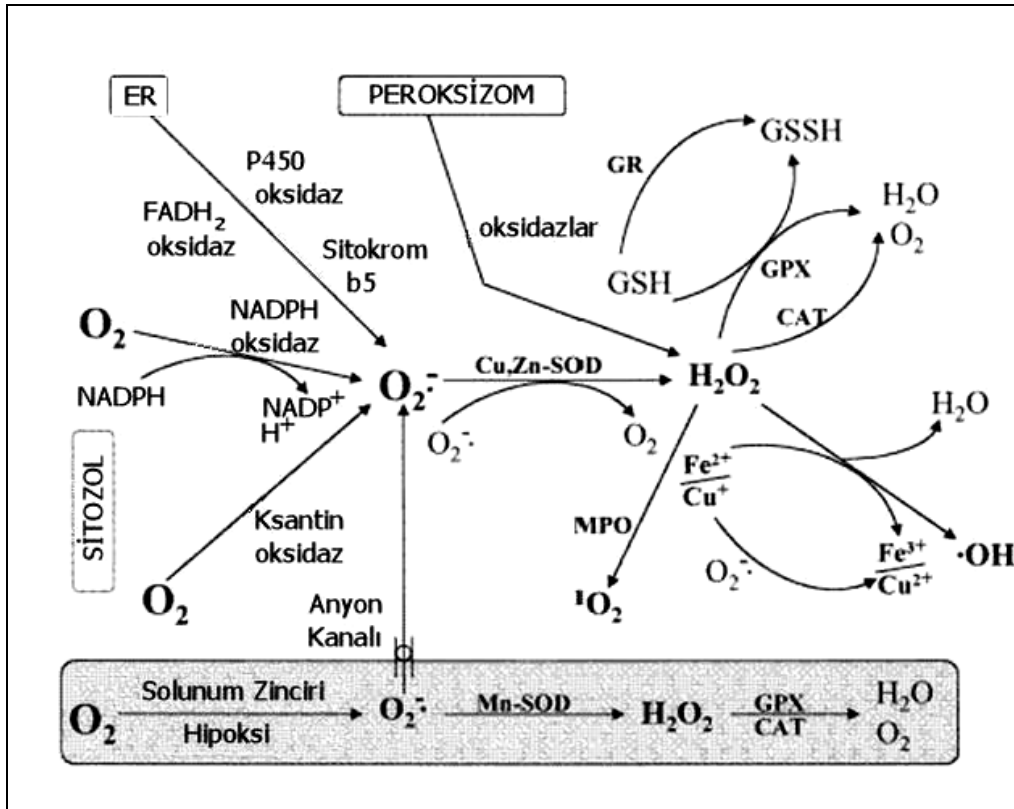


Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar (2-8).



Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Süperoksit radikalının lipit çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksidin lipit çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir (Halliwell ve Gutteridge 1984).

Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Mates ve arkadaşları (1999) peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksi asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazların, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olduğunu şekil halinde vermiştir (Şekil 2-5). Ancak peroksizomlarda katalaz enziminin aktivitesi çok yüksektir ve hücrede oluşan hidrojen peroksitin hidroksil radikali oluşumunu önlemek için suya ve oksijene ayrışmasını sağlar. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon ise, dokularda açığa çıkan hidrojen peroksit, lipid peroksitleri, askorbik asit ve serbest radikalleri indirger ve glutatyon peroksidaz enzimi için kofaktör olarak görev yaparak sonuçta okside olur (Fang ve ark. 2002). Glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidazın etkisiyle hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun tekrar indirgenmiş glutatyonla dönüşümünü katalize eder (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999).



Şekil 2-5: Reaktif oksijen türlerinin rejenerasyonu ve antioksidan savunma mekanizmaları - Mates ve arkadaşları (1999)'dan

ER: Endoplazmik retikulum; GR: Glutatyon redüktaz; GPX: Glutatyon peroksidaz; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; MPO: Miyeloperoksidaz; ¹O₂: Singlet oksijen; O₂•⁻: Süperoksit radikali; •OH: Hidroksil radikali.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur.

2.1.1.5. Hidroksil Radikali ($\text{HO}^\bullet$)

Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Mangan ve kobalt da bu bakımdan aktif olsalar da, vücuttaki derişimlerinin düşüklüğü nedeniyle demir ile kıyaslandıklarında çok daha az etkindirler. Serbest metal iyonlarının vücut sıvılarındaki derişimi pratik olarak sıfır kabul edilir, ölçülemeyecek kadar azdır. Demir, metabolizmasının her aşamasında mutlaka ya bir proteine (ferritin, transferin, laktoferrin gibi) bağlı durumda ya da küçük organik moleküllerle (sitrata, ADP, ATP gibi) kompleks oluşturmuş şekilde bulunur. Bakır, seruloplazmine sıkı bağlıdır; metal iyonlarının proteinlere bağlı şekilde tutulmaları, hidroksil radikali yapımını önlemenin en güvenli yoludur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır (10^{-9} sn) (Kılınç ve Kılınç 2002).

Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksitteki kovalent bağların homolitik kırılması veya suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda hidroksilradikali oluşur. Demir tuzları ve hidrojen peroksit varlığında aşağıdaki reaksiyonlar meydana gelebilir (2-9; 2-10; 2-11; 2-12; 2-13):



Bu reaksiyonların sonucunda demir tuzları varlığında hidrojen peroksit, su ve oksijene dönüşmektedir (2-14):



Bakır (I) tuzları da hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturmaktadır (2-15):

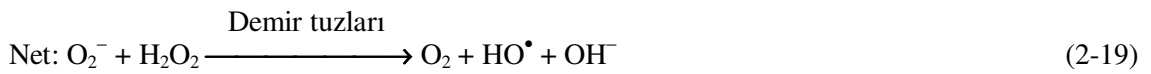


Hidroksil radikali reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (2-16) (Halliwell ve Gutteridge 1984).

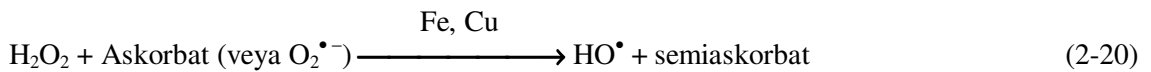
Haber-Weiss reaksiyonu:



Demir tuzları ile katalizlenen Haber-Weiss reaksiyonu (2-17; 2-18; 2-19) (Halliwell ve Gutteridge 1984):



Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamlarda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden, hidrojen peroksitten hidroksil radikali yapımı sürekli bir duruma gelir (2-20):



Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi ile hidroksil radikali oluşumu, vücutta üretilen hidrojen peroksit derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. (Kılınç ve Kılınç 2002).

2.1.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

2.1.2.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

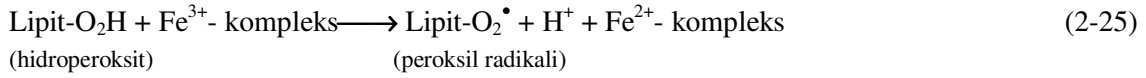
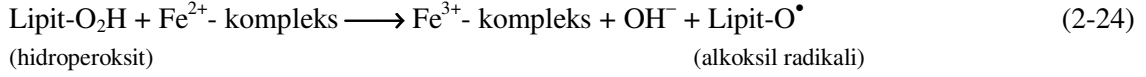
Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Hücre membranlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit radikalleri ve lipit peroksit radikalleri ($\text{LOO}^\bullet$)'nin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna **nonenzimatik lipit peroksidasyonu** denir. Nonenzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri oluşur. Lipit peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (2-21, 2-22, 2-23) (Halliwell ve Gutteridge 1984; Halliwell ve Chirico 1993).



Plazma membranında ve subsellüler organellerde lipit peroksidasyonu serbest radikal ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalının oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir (2-24, 2-25).



Oksidasyona uğrayan lipitler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Membranın integral veya periferik proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipitlerden oluşan lipit alkoksil ve lipit peroksil radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerinde hidroksil radikalinden daha etkin olarak hasar oluşturabilmektedir. Hidroksil radikale göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipit hidroperoksitler (LOOH) ve karbonil bileşikler, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler (Burçak ve Andican 2004).

Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine **enzimatik lipit peroksidasyonu** denir.

2.1.2.2. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü doğal olarak veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. İyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları ve TNF- α 'ın etkisi sonucunda insan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez kimyasal oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir. Bu etkenler, DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler.

DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, sağlıklı bireylerde de çok düşük düzeylerde hasar saptanmaktadır. ROT oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerinde azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması, oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (Burçak ve Andican 2004). DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olur (Müftüoğlu 2003).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu^{2+} iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-hidroksi-2'-deoksiguanozindir (8-OHdG). 8-OHdG oksidatif DNA baz hasarının bir "biomarker"ı olarak kabul edilmektedir (Aruoma 1998).

2.1.3. Serbest Radikallere Karşı Hücresel Savunma (Antioksidan Savunma Sistemleri, Antioksidanlar)

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için çeşitli savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar **antioksidan savunma sistemleri** veya kısaca **antioksidanlar** olarak bilinirler.

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz, sitokrom oksidaz gibi enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır (Altan ve ark. 2006).

Antioksidanlar vücutta üretildikleri (endojen kaynaklı) gibi, dışarıdan (eksojen kaynaklı) gıda yolu ile de alınabilmektedir. Gıda yolu ile alınan antioksidanlar doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Bitkiler doğal antioksidan içeriği yüksek olan önemli eksojen kaynaklardır ve antioksidan etkileri yapılarındaki enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz v.b.),

aminoasitler, vitaminler, karotenoitler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşiklerden ileri gelir.

Doğal antioksidanlardan olan karotenoitler, α -tokoferol ve askorbik asit en iyi bilinen ve en geniş kapsamlı kullanılan antioksidanlardır. Hemen hemen tüm gıdalarda eser miktarda dahi olsa bulunurlar.

Karotenoitler 40 karbonlu izoprenoid veya tetraterpen yapıları ve konjuge çift bağların getirdiği doymamışlık derecelerinden dolayı antioksidan özellik gösterirler (Reische 2002). Bu yapının sağladığı radikal toplama özelliği, çoğu epidemiyolojik olmak üzere, yapılan araştırmalarda bazı kanser tiplerinde, kalp rahatsızlıklarında ve dejeneratif hastalıklarda koruyucu etkilerinin tespitiyle ortaya konmuştur (Stahl ve Sies 2005).

E vitamini, yağda çözünebilen, güçlü antioksidan aktiviteye sahip biyolojik bir antioksidandır. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterir. Zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur (Fang ve ark. 2002). E vitamini süperoksiti, hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL-kolesterol) peroksidasyonu aterosklerozun ilerlemesine neden olduğu için peroksidasyonu engelleyen E vitamini hücre dışı ortamda önemli bir role sahiptir (Fang ve ark. 2002; Reische 2002).

Askorbik asit, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler. GRAS statüsü sınırsız olduğu için en çok bitkilerden elde edilen antioksidandır (Reische 2002).

Besinlere koruyucu olarak eklenen butil hidroksi toluen (BHT), butil hidroksi anizol (BHA), etoksikuin (EQ), propilgallat (PG), dodesilgallat (DG) gibi eksojen kaynaklı sentetik antioksidanların organizmadaki antioksidan mekanizmayı destekleyici etkileri bulunmaktadır. Antioksidan madde içeren gıda maddelerinin tüketimi sonucunda kanser, kalp ve damar hastalıklarının oranında büyük ölçüde azalma görüldüğü saptanmıştır.

2.2. *Aloe vera*

2.2.1. Botanik Özellikleri

A. vera (L.) Burm. fil. (*Aloe barbadensis* Miller) Aloaceae (Smith 1993, Kaynak: Reynolds 2004) ailesinin ve dünyada yaklaşık 400 türü bulunan (Newton 2001, Kaynak: Reynolds 2004) *Aloe* cinsinin bir üyesidir (Şekil 2-6). Asıl vatanı Afrika, Güney Arap ülkeleri ve Madagaskar'ın yağmur almayan bölgeleri olup zamanla tropik ve subtropik iklimin egemen olduğu her yerde yayılış göstermiştir (Grindlay ve Reynolds 1986). Genellikle kayalık zeminlerde yetişen, kserofit sınıflandırmasına giren ve sukkulent karakterli bir bitkidir (Newton 2004, Kaynak: Reynolds 2004). Türkiye'nin Güneybatı bölgesinde (Demre) Romalılar döneminde yapılan kültürden kalma, yabanileşmiş *A. vera* türü yetişmektedir (Baytop 1984).



Şekil 2-6: *A. vera* (L.) Burm. fil. (*A. barbadensis* Miller) - <http://www.aloeverafarms.com> (10.07.2008)'den.

2.2.2. Etimolojisi

Kılıç şeklindeki yaprakları dolayısıyla adı Arapça “saber” (Kılıç) olan *A. vera* genellikle sarı renkte çiçek açtığından ve Anadolu’da eski yıllarda yapraklarından elde edilen kinin tadındaki koyu sarı özsu su süt çocuklarının memeden ayrılmasında kullanıldığı için ülkemizde Sarısabır diye anılır. Bitkinin cins adı Arapça parlak acı anlamındaki “alloek” den, epitet adı olan vera ise hakiki anlamındaki “wahre” den gelir (Baytop 1999, Kaynak: Çandöken 2006).

2.2.3. Bileşimi

Akev (2004) *A. vera* yapraklarının amino asitler, mannanlar, antrakinonlar, antioksidan enzimler, vitaminler, mineraller ve lektinler gibi biyolojik sistemlerde faydalı roller üstlenen birçok kimyasal madde içerdiğini tablo halinde vermiştir (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: *Aloe*'de bulunan bileşenler - Akev (2004)'den.

Bileşenin genel adı	Çeşitleri	Etkileri
Amino asitler	20 amino asit	Besin katkısı olan 8 esansiyel amino asidi sağlar
Antrakinonlar	Aloin (A ve B), aloe emodin, aloetik asit, barbaloin, antranol, emodin, vs.	Laksatif
Enzimler	Alkali fosfataz, amilaz, karboksipeptidaz, katalaz, peroksidaz, selüloz, lipaz, siklooksijenaz, bradikininaz.	Proteinlerin ve karbohidratların sindirimi, serbest radikallerin nötralizasyonu
Mineraller	Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na, Zn.	Besinsel katkı
Vitaminler	A, C, E, B, Kolin, B ₁₂ , Folik asit.	Besinsel katkı
Karbohidratlar	Monosakkaritler: Glukoz, fruktoz Polisakkaritler: Mukopolisakkaritler (glukomannanlar, asemannan, polimannoz).	Antienflamatuar Antiviral İmmunostimulan Antikanser
Steroller	β -Siteroller, lupeol, kolesterol, kampesterol.	Antienflamatuar Antiseptik (ülseratif kolit, artrit, gastrik reflü)
Lektinler	Aloctin I ve II	İmmunostimulan
Salisilik asit		Antienflamatuar
Saponinler		Antiseptik

2.2.4. Kullanımı ve Etkileri

Aloe türleri yüzyıllar boyunca tedavide kullanılmışlardır (Malkoç 1997). *A. vera* tarihinde ilk defa Mısırlılar tarafından güzellik banyosu ve cilt bakımı için kullanılmaya başlanmıştır. *A. vera* hakkındaki en eski kaynak ise yaklaşık 3500 yıl önce Mısır'da yazılmış olan *A. vera*'nın hazımsızlıkta, yara ve yanık tedavilerinde kullanıldığından söz eden Ebers Papirusları'dır (Atalay 1991, Kaynak: Malkoç 1997). Dioscorides'in eserinde aloin adlı bir bileşiğin pürgatif olarak adı geçmektedir (Defacqz ve Weitz 1928 p.386). 512 yılında bir Kodeks'te ise *Aloe* ile ilgili bir ilüstrasyon görülmektedir (Reynolds 2004). Bununla birlikte, 10. yüzyılda İngiltere'de, 17. yüzyılda da Doğu Hindistan'daki kayıtlardan ilaç olarak kullanımına ilişkin bilgiler elde edilmiştir (Barnes ve ark. 2002, Kaynak: Çandöken 2006).

ABD ve Avrupa'da sağlık, gıda, kozmetik endüstrisinde kullanılan ve bitkisel olarak kullanımı hızla artmış olan *A. vera* yararlı etkilerinden dolayı şifalı bitki, tıbbi bitki olarak kullanım alanı gün geçtikçe genişleyen ticari bir sektör halini almıştır (Eshun ve He 2004). Ancak ürünlerin doğru kullanımı hakkında, losyon, tonik ve yiyecek olarak abartılı fikirler (Grindlay ve Reynolds 1986) ve bunun getirdiği şüpheler, *A. vera* ürünlerinin hem ticari, hem bilimsel açıdan merak uyandıran bir konu olarak incelenmeye alınmasına sebep olmuştur.

Capasso ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan geniş bir derlemede bildirildiği gibi, *A. vera* ile ilgili yapılan çalışmalar *Aloe*'nin farmakolojik etkilerini ve etken maddelerini bir bir ortaya çıkarmıştır.

Aloe türlerinin laksatif, antienflamatuar (Saito 1993), immunostimulan (Capasso ve ark. 1998), antiseptik, yara ve yanık iyileştirici (Heggars ve ark. 1995; Chitra ve ark. 1998), aktiviteleri bilimsel literatürde yer almaktadır. *Aloe* yaprak ekstrelerinin hipoglisemik (Beppu ve ark. 1993; Koo 1994; Yongchaiyudha ve ark. 1996) ve antitümör (Winters ve ark. 1981; Saito 1993) etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. *Aloe* yaprak pulpası ekstresi ile yapılan akut deneyler sonucunda, kan şekeri düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmesine karşın (Okyar ve ark. 2001a), kronik deneyler sonucunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (Okyar ve ark. 2001b).

1986 yılında Gribel ve Pashinskiî fareler üzerine yaptıkları deneylerde *Aloe* suyunun tümör hücrelerinin metastaz yapmasını, 1993 yılında ise Tsuda ve arkadaşları

Aloe ekstresinin sıçanlarda preneoplastik hepatoselüler lezyonları engellediği sonucuna varmışlardır. Daha sonraki yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda da *Aloe* ekstrelerinin tümör oluşumunu engellediği veya geri çevirdiği bildirilmiştir (Corsi ve ark. 1998; Akev ve ark. 2007a).

Yapısında en çok aloin, aloe emodin ve aloresin gibi fenolik bileşikleri içerdiği bildirilen *A. vera* yapraklarından hazırlanan ekstrelerin uygulanmasının, deneysel olarak tip II diabetes oluşturulan sıçanların lens (Özsoy ve ark. 2002-2003), böbrek (BolKent ve ark. 2004), karaciğer (Can ve ark. 2004), kalp ve deri dokularında (Özsoy ve ark. 2008) lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada farelerin 3, 7 ve 10 gün radyasyona maruz bırakıldıktan sonra *A. vera* ile uygulanan tedavinin sonucunda karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında, radyasyonun indüklediği, MDA oluşumunda anlamlı bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. *Withania somnifera* ve *A. vera* ekstrelerinin kombine şekilde kullanılması sonucunda, her iki ekstrenin beyindeki oksidatif hasarı indirgemede daha etkili oldukları bildirilmiştir (Parihar ve ark. 2004).

Aloe bitkisinin biyolojik etkileri birçok araştırmayla bildirildiği halde bu etkilerden sorumlu bileşiklerin hangileri olduğu henüz açıklık kazanmamıştır (Eshun ve He 2004). Elde edilen bulgulara bakıldığında ise, çağlar boyu insanların bu bitkiyi tedavide doğru olarak kullandıkları görülmektedir. Ancak, *A. vera*'nın tedavide kullanılabilmesi için bu konuda araştırmaların devam etmesi gerekliliği tartışılmaz.

2.3. Lektinler

Lektinler için ilk tanımlama olan hemaglutinin 1888'de Dorpat Üniversitesi'nde doktora çalışmalarını sürdüren Peter Hermann Stillmark tarafından yapılmıştır (Stillmark 1888, Kaynak: Goldenstein ve Hayes 1978). Stillmark *Ricinus communis* bitkisinin tohumlarından elde ettiği oldukça toksik bu hemaglutinine **ricin** adını vermiştir. Lektin terimi ise ilk olarak 1954 yılında Boyd ve Shapleigh (Boyd ve Shapleigh 1954) tarafından Latince seçme anlamına gelen "legere" kelimesinden türetilerek literatürdeki yerini almış olup, 27 yıl süren çalışmalar sonunda, 1981 yılında, Goldstein'in (Goldstein ve ark. 1980) önerisi üzerine "bağışıklık sisteminden kaynaklanmayan, birden fazla şeker bağlama bölgesine sahip, hücreleri veya karbohidrat içeren bileşikler (glikoprotein vs.) kümeleştirerek çöktüren, protein veya

glikoprotein yapısındaki moleküller” tanımlaması ile Uluslararası Biyokimya Birliği Adlandırma Komitesi’ndeki yerini de almıştır (Dixon 1981).

Günümüze kadar aglutinin, fitoaglutinin, hemaglutinin, fitohemaglutinin ve protektin gibi değişik isimlerle anılan bilimsel lektinler, yapılan ilk çalışmalarda başlıca Leguminosae familyası olmak üzere (Sharon ve Lis 1990) bitkilerden izole edildikleri için sadece bitkilere özgü bileşikler olarak düşünülmüştür. Ancak yapılan araştırmalarla lektinlerin doğada sadece bitkilerle sınırlı kalmayıp değişik biyolojik sistemlerde (bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal orijinli) yaygın olarak bulunduğu anlaşılmıştır (Goldstein ve Hayes 1978; Akev 1989; Sharon ve Lis 1989; Ateş ve Akın 1994; Gabius 1997).

Moleküler yapı olarak genellikle glikoprotein yapısında olmalarına karşın, karbohidrat içermeyen lektinlerin varlığı, lektinlerin protein olmaları dışında ortak bir yapı özelliklerinin bulunmadığını düşündürmektedir (Lis ve Sharon 1981a). Lektinler genellikle 2 ile 4 birimden oluşurken *Triticum vulgare*’de (WGA) olduğu gibi 18 farklı polipeptit zincirinden oluşan lektinlere de rastlamak mümkündür. Kural olarak her bir birim, bir karbohidrat artığına zayıf nitelikli hidrojen köprüsü ile bağlanma özelliğindedir. Bağlandıkları karbohidratların yapılarını değiştiren glikozidazlar ve glikoziltransferazların aksine bağlandıkları karbohidratlarda yapısal değişikliğe neden olmamaları ile enzimlerden farklılık gösteren lektinler üretimlerinin antijen uyarılmasıyla değil genler tarafından kontrol edilmesiyle de antikorlardan farklılık gösterirler (Seyrek ve Bildik 2001).

Glikoprotein yapısındaki lektinlerin karbohidrat birimlerinde en çok mannoz, glukozamin, galaktozamin, N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin bulunur. Daha az miktarda ise ksiloz, arabinoz ve fukoza rastlanmıştır (Sharon ve Lis 1972). Protein kısmındaki total amino asit içeriklerinin % 30 kadarını aspartik asit, serin ve treonin oluşturur (Sharon ve Lis 1972). Biyolojik aktiviteleri için yapılarındaki Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyarlar (Sharon ve Lis 1990). Molekül ağırlıkları ise 26 000 ile 400 000 dalton arasında değişmektedir (Akev 1989).

Lektinlerin biyolojik özelliklerinden biri de insan ve hayvanlarda eritrositlerin ve çeşitli hücre tiplerinin kümeler halinde çökmelerine neden olmalarıdır. Aglutinasyon olarak tanımlanan bu olay lektinlerle glikokonjugatların karbohidrat birimleri arasında anahtar kilit prensibi esasına göre şekillenir ve aglutinasyon lektinlerin protein

kısımlarının kendi reseptörlerinin yapısındaki karbohidrat zincirlerinden en az iki karbohidrat yapısına bağlanması sonucunda gerçekleşir (Lis ve Sharon 1986).

Bitki lektinlerinin insan kan grupları üzerinde göstermiş olduğu aglutinasyon etkisi (hemaglutinasyon) ve farklı lektinlerin farklı kan gruplarına spesifitesinin farklı olduğu bildirildikten (Bird 1959) sonra lektinlerin karakterizasyonunda bu özellikleri de incelenmeye başlanmıştır.

Lektinlerin hücre tanınmasında, hücre adezyonunda, hücreler arası haberleşmede, sinyal transferinde, serumdaki bazı glikoproteinlerin dolaşım sistemindeki döngüsünün düzenlenmesinde, hücre içi protein transportunda, döllemede, hücre farklılaşmasında anahtar rol oynadıkları, lenfosit hücrelerinin çoğalmasını uyardıkları, kanser hücrelerinin gelişimini engelledikleri, insülin reseptörlerine bağlanmaları sonucu insülinomimetik (insülin benzeri) etki gösterdikleri, fungal gelişimi engelledikleri, maya hücrelerinin fagositozunda rol aldıkları, toksik oldukları ve büyümenin kontrolünde, interferon ve sitokin salgılanması, bakterilerin makrofajlar tarafından tanınması, makrofajların peroksit salınımını uyarması, fagositoz için vakuol oluşumunun uyarılması, bazofil ve mast hücrelerinden histamin salınımını uyarması gibi immunolojik ve patolojik olaylarda hücrelerin transformasyonunda, metastazda, embriyogenezde, ekzositoz ve endositozda rol oynadığı bildirilmiştir (Lis ve Sharon 1986; Seyrek ve Bildik 2001).

Lektinler hücre yüzeyi yapısının ve biyosentezinin aydınlatılmasında genetik ve glikobiyolojinin çalışma alanını oluştururlar. Karbohidrat içeren polimerlerin izolasyonunda, saflaştırılmasında ve yapılarının aydınlatılmasında lektinlerden yararlanılmaktadır. Bunun yanında kan gruplarının incelenmesinde ve oluşumunun aydınlatılmasında, bakteri, virüs, hayvan hücrelerinin ve hücre popülasyonlarının yüzeylerindeki kompleks karbohidrat yapılarının aydınlatılması için yapılan çalışmalarda lektinlerden yararlanılır (Rüdiger 1998). Bitkilerdeki lektinlerin şeker taşınmasında ve depolanmasında rol oynayabileceği açıklanmıştır (Lis ve Sharon 1986).

Lektinlerin tedavi amaçlı kullanılabileceklerine ilişkin birçok araştırma yapılmıştır. İşaretli lektin kullanılarak çeşitli metabolik faaliyetler ve hastalıklar teşhis edilmektedir. Örneğin kanser teşhisinde lektin reseptörlerinin normal hücrelerde dağınık halde bulunduğu, kanserli hücrelerde ise birarada bulunduğu bilinmektedir (Vierbuchen

1991, Kaynak: Gül ve ark. 2008). Anadolu ve arkadaşları (1992) deri kanserinin teşhisinde işaretli lektin kullanmışlardır.

Canlı türlerinin teşhisinde örneğin malaria hastalığına neden olan sivrisinek türlerinin ve enfeksiyona neden olan bakteri türlerinin teşhisi, lektinin hücre yüzeylerine bağlanma durumuna göre yapılmaktadır. İnsanlardaki kas hastalıkları, kas fibrillerinin hücre yüzey değişiklikleri lektin kullanılarak teşhis edilmeye çalışılmıştır (Pena ve ark. 1981). Derideki keratinosit hücrelerinin subpopulasyonu lektin kullanılarak teşhis edilmiştir (Desantis ve ark. 2003).

Concanavalin A (Bloksma ve ark. 1983), soya fasulyesi (Öner ve Akev 1985) ve buğday tohumunda bulunan aglutininler (Ganguly ve Das 1994), *Viscum album* aglutinini (VAA) (Zarkovic ve ark. 1997) ve *Datura stramonium* aglutinini (Sasaki ve ark. 2002) üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Metastazın şekillenebilmesi için metastaz yapan hücrenin karbohidrat artıkları hedef dokunun lektinlerine tutunmaktadır. Beuth ve arkadaşları (1988) yaptıkları *in vitro* çalışmalarda bir çok insan tümör hücresinin hepatositlere adezyonlarının galaktoz veya arabinogalakтан kullanımı ile engellendiğini rapor etmişlerdir.

Birçok lektinin *in vitro* ve *in vivo* antitümör özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Lektinler, özellikle kanserli hücrelerin zarlarına veya reseptörlerine bağlanarak sitotoksisite, apoptoz ve tümör gelişmesini engelleyen tedavi edici ajanlar olarak kullanılmaktadırlar (De Mejía ve Prisecaru 2005). Bugün kullanılmakta olan kemoterapötik ilaçların normal vücut hücreleri üzerine oldukça fazla yan etkileri bulunmaktadır. Hücreler için toksik olan ilaçlar (metotreksat, 5'-dezoksifloruridin, filotoksin etoposid vs.) eğer tümörlü dokular için spesifik olan bir karbohidrat ünitesi ile bağlandıktan sonra vücuda verilirse şüphesiz ki toksik madde tümör hücrelerinde lokalize olacak ve bunun normal somatik hücrelerdeki etkisi minimuma indirilecektir (lectin-mediated drug-targeting).

Spesifik karbohidrat bağlama özelliklerinden dolayı lektinler, kompleks hücre ekstraktlarından glikoproteinlerin ve enzimlerin saflaştırılması, glikoprotein ve polisakkaritlerin izolasyonu, sodyum dodesil sülfatlı poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile glikoproteinlerin saptanması, kanser araştırmaları ve hücre tiplemesi gibi yaygın araştırma alanlarında güçlü vasıtalar olarak kullanılmaktadır.

Lektinler ayrıca, mitojenik özelliklerinden dolayı lenfosit sayısının artırılmasında ve kromozom bozukluklarının incelenmesinde de kullanılmaktadır.

Lektinlerin fonksiyonları günümüzde hala tartışmalıdır. Bunlar için aranacak tek bir rol şüphesiz yanıltıcı olacaktır. Karbohidrat spesifitesi yönünden aynı oligosakkaritleri tanıyan benzer iki lektinin dokularda gösterdikleri farklı dağılım bunların araştırılması gereken farklı roller üstlendiğini düşündürmektedir.

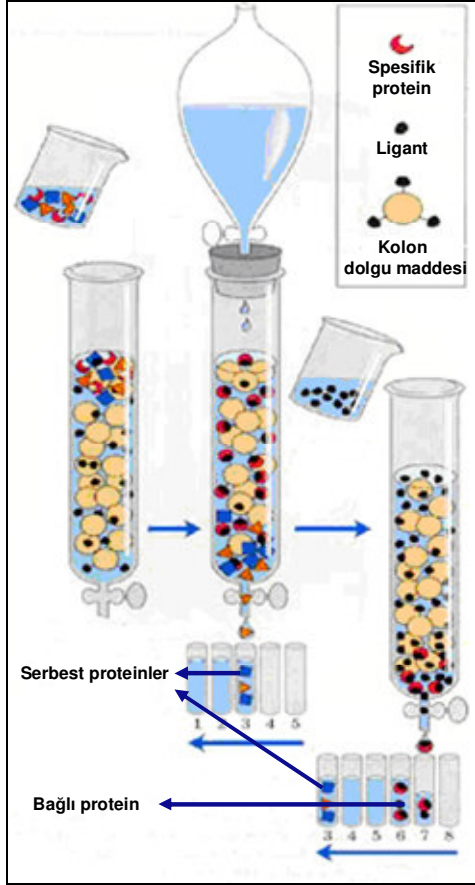
2.4. Affinite Kromatografisi

Affinite kromatografisi, proteinlerin çok küçük molekülleri çok spesifik bir şekilde bağlaması özelliğine dayanan ayırma yöntemidir. Kolonun dolgu maddesi (matriks)'ne spesifik protein ile kompleks yapabilen ligant bağlanır (Tablo 2-3).

Tablo 2-3: Affinite kromatografisinde kullanılan bazı ligantlar.

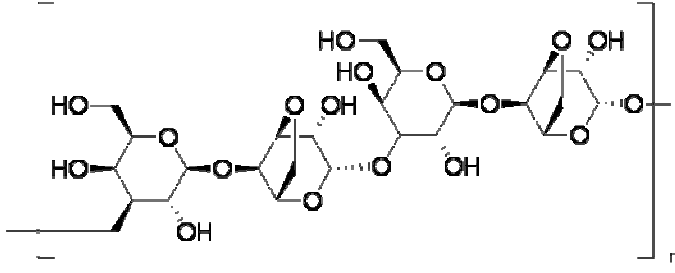
Saflaştırılacak madde	Ligant
Enzim	Substrat, substrat analogu, kofaktör, inhibitör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzeyi reseptörü
Nukleik asit	Komplemanter baz sekansı, histon, polimeraz
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

Lehninger ve arkadaşları (1993 p. 139) ligant ile kompleks yapan spesifik proteinin, matrikse bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinlerin kolonu terk ettiğini şekil halinde vermiştir (Şekil 2-7). Bağlı protein, daha sonra, pH değişikliği / tuz çözeltileri veya ligant ilavesiyle kolondan elüe edilir.



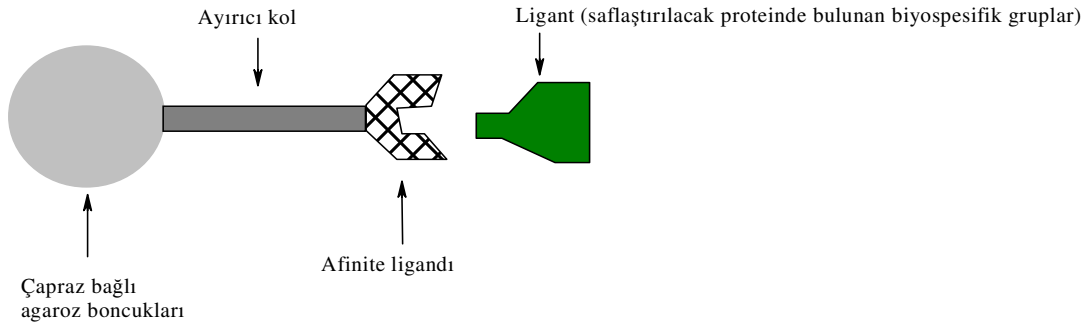
Şekil 2-7: Affinite kromatografisi - Lehninger ve arkadaşları (1993)'den.

Affinite kromatografisinde kullanılabilecek dolgu maddeleri suda çözünmeyen, makromoleküllerin geçişine izin verecek boyutta gözenekli ve küresel tanecikli, biyolojik ve kimyasal yıkımlara karşı inert, kimyasal modifikasyonlara uygun ve proteinlerle çok zayıf etkileşime giren maddelerdir. Affinite kromatografisinde matriks olarak kullanılan en uygun madde agarozdur. Agaroz, deniz yosunlarındaki agar-agar adlı heteropolisakkaritten elde edilir. Agaroz, tekrarlanan D-galaktoz ve 3,6-anhidro-L-galaktoz birimlerinden oluşur. Agaroz matriks üzerine birçok kimyasal grup (fonksiyonel grup) kovalent olarak bağlanabilir ve bu fonksiyonel gruplarla birçok maddeler kenetlenebilir. Piyasada en çok kullanılan Sepharose® (Sefaroz)'dur (Şekil 2-8).



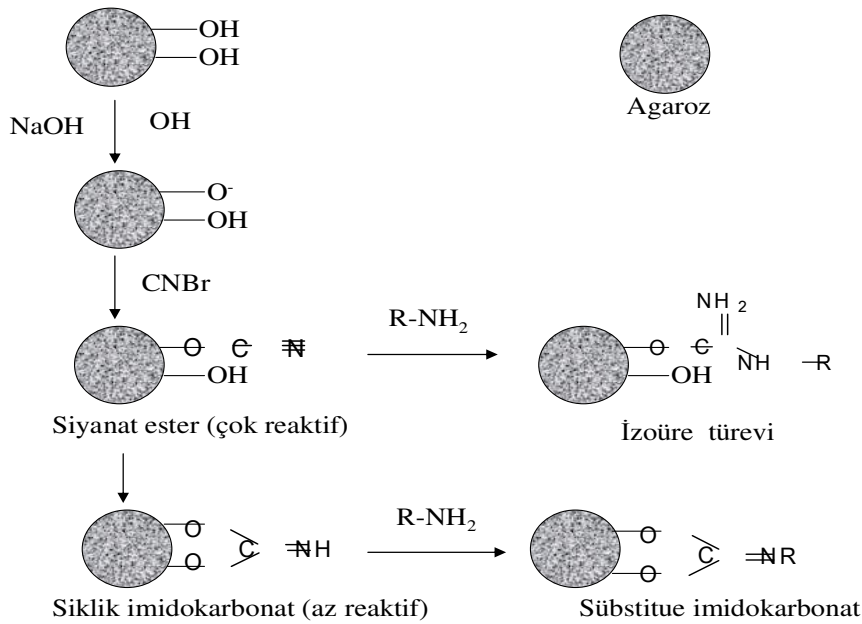
Şekil 2-8: Sefaroz-4B'nin yapısı.

Çeşitli agarozların fonksiyonel grup içeren şekilleri olduğu gibi, bu fonksiyonel gruplara başka gruplar da bağlanarak agarozun daha spesifik olarak belirli moleküllere affinite göstermesi sağlanabilir. Biyolojik proteinlerin aktif bölgeleri genellikle molekülün iç kısmında derinde bir yerdedir ve küçük ligantlarla (örneğin enzimin substratı) hazırlanan matrikslere çok düşük düzeyde bağlanır. Esasen matrikse bağlı grupların mümkün olduğunca matriksten uzak olması daha uygundur, çünkü bu şekilde matrikse adsorbe olacak molekül matriksten uzaklaşmış olur ve matriks ile adsorbe olacak madde arasında spesifik olmayan elektrostatik çekimler engellenmiş olur. Matrikse bağlı fonksiyonel grupları matriksten uzaklaştıran ara gruplara ayırıcı kol (spacer arm) adı verilir. Walsh (2007 p. 149) bu ayırıcı kolun uzun oluşunun matriks ile matrikse adsorbe olacak madde arasındaki spesifik olmayan çekim kuvvetlerini yok ederek maddeyi doğrudan doğruya matriks ligandındaki fonksiyonel gruplarına bağlandığını şekil halinde göstermiştir (Şekil 2-9). Ayırıcı kol olarak en çok kullanılan kimyasal madde siyanojen bromür (CNBr)'dür. Çok toksik bir madde olduğundan genellikle hazır ticari preparatları (CNBr ile aktive edilmiş Sefaroz 4B) kullanılır.



Şekil 2-9: Affinite kromatografisinin prensibinin şematik gösterimi - Walsh (2007)'den.

Siyanojen bromür reaksiyonu kompleks ürünler oluşturur, fakat esas reaktif bileşenin siyanat esteri olduğu gösterilmiştir (Wilchek ve ark. 1984). Aktif agaroz zayıf alkali şartlarda primer aminlerle kolayca reaksiyona girerek büyük oranda izoüre türevleri verir (Şekil 2-10). Agarozun siyanojen bromür ile aktivasyonunda siyanat esteri, halkalı imidokarbonat ve N-süstitüe imidokarbonat oluşur. Aktif agaroz amin gruplu ligantlar ile izoüre türevi oluşturur.



Şekil 2-10: Agarozun siyanojen bromür ile aktivasyonu ve aktif agarozun amin gruplu ligantlar ile oluşturduğu ürünler (siyanat esteri, halkalı imidokarbonat, N-süstitüe imidokarbonat, izoüre türevi) - Uslan (1988)'den (İçinde: Telefoncu 1988).

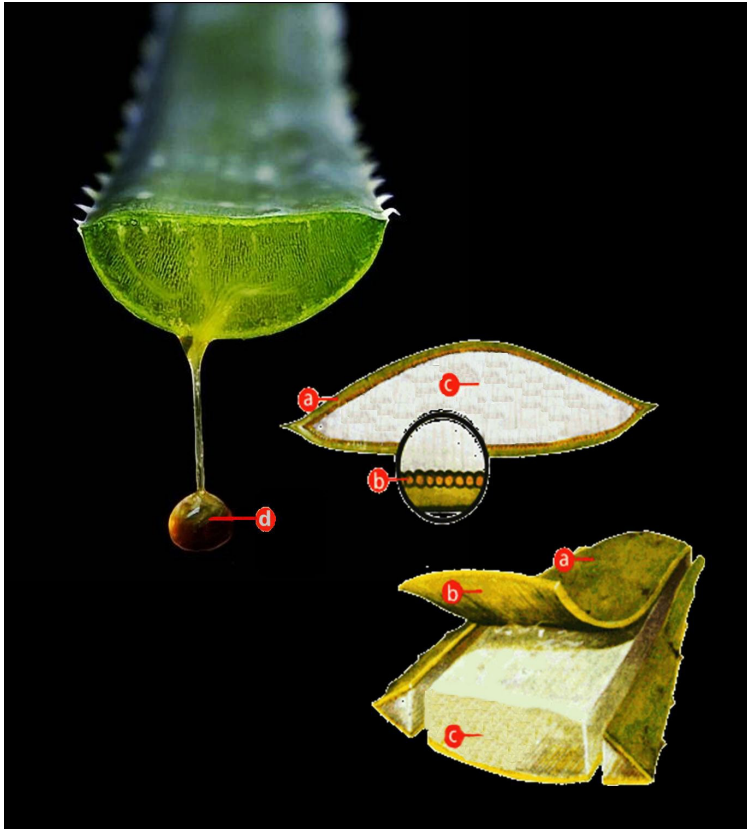
Ligant, saflaştırılacak makromoleküle özel ve seçimli affinite gösteren, aktif taşıyıcıya kovalent olarak bağlanan küçük moleküldür. Siyanojen bromür ile aktive edilmiş agarozla kolaylıkla ligant bağlanabilir. Siyanojen bromür ile aktive edilmiş sefarozun ve ligantın aktif grupları aminlerle hidroliz olması nedeniyle Tris tamponu serbest olan amino gruplarını inaktive etmek için kullanılmaktadır.

Affinite kromatografisi çok kısa sürede uygulanabilen bir yöntemdir, çünkü çoğunlukla çok küçük hacimli kolonlar kullanılır. Bu yöntemle, genellikle diğer yöntemlerle elde edilemeyen 1000 gibi saflaştırma oranlarına aşağı yukarı % 100 verimle ulaşılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan *A. vera* (L.) Burm. fil. bitkisinin yaprakları bitkinin kültürü yapılan İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Süleymaniye Botanik Bahçesi Serası'ndan temin edilmiştir. *A. vera* numunesi İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'nda 65 118 numarası ile kayıtlıdır. Yapılacak araştırmalarda farklı amaçlara göre gereken miktarda büyük, etli yaprak bitkinin kaidesinden bir bıçak yardımıyla kesildikten sonra dik olarak bir behere konularak antrakinsonca zengin sarı renkli usarenin akması sağlanmıştır. Daha sonra yapraklar distile su ile yıkanmış ve filtre kağıdı ile kurutulmuştur. Çalışmalarımızda jelden temizlenmiş yaprak kısımları (pulpa) ve yaprak içi jel kısımları kullanılmıştır (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: *A. vera* yaprak enine kesiti ve sembolik görüntüsü - <http://www.worth1000.com> (11.07.2008)'den değiştirilerek.

a) Epidermis, b) Aloince zengin hücreler, c) Yaprak jeli, d) Antrakinsonca zengin sarı renkli usare.

3.2. Kullanılan Gereçler

A. vera yapraklarının homojenizasyonunda, parçalayıcı (Waring)

Santrifüj işlemlerinde, masa tipi soğutuculu santrifüj (Heraeus-Megafuge 1.OR)

Rotaevaporatör (Büchi Rotavapor R-200A)

Antioksidan aktivite tayinlerinde, su banyoları (Thermomix BU ve Grant SB2)

Affinite kromatografisinde elüatların toplanmasında, fraksiyon toplayıcı (Gilson FC 204)

Spektrofotometrik ölçümlerde, spektrofotometre (Shimadzu UV-1208)

pH tayininde, pH metre (Radiometer 92)

Manyetik karıştırıcı (Kermanlar)

Ultrafiltrasyon hücresi (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 U.S.A.) ve ultrafiltrasyon membranı (Amicon, PM 10)

Elektroforez için güç kaynağı (LKB 2301)

Vertikal jel elektroforezi cihazı (GIBKO BRL Model V 15.15 No 21080-015)

Çalkalayıcı (IKA KS260)

Otomatik pipet takımı (Gilson ve Eppendorf)

Vorteks karıştırıcı (VELP Shientifica)

Derin dondurucu (Bosch)

Cam kolon (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden)

Hemaglutinasyon aktivitesi tayininde, ışık mikroskobu (Olympus)

Etüv (Heraeus)

Kromatografilerde soğuk dolap (Nuare)

Dijital fotoğraf makinesi (Sony Cyber-shot 5,1 megapixels MPEG movie VX)

Liyofilizatör (Labconco) kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Flavonoit miktar tayininde sodyum nitrit (NaNO_2 ; Merck 106544), alüminyum klorür ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Merck 101083), sodyum hidroksit (NaOH ; Merck 106462) ve standart olarak kateşin (Fluka 22110) kullanıldı.

Karotenoit miktar tayininde aseton (Merck 100013) ve n-heksan (Sigma 248878) kullanıldı.

Askorbik asit miktar tayininde m-fosforik asit (H_3PO_4 ; Merck 100546) ve 2,6-diklorofenol-indofenol-sodyum (DCIP; Merck 103028) kullanıldı.

α -Tokoferol miktar tayininde pirogallol (Merck 100612), batofenantrolin (Fluka 11880), absö etanol (Riedel 32221) ve standart olarak α -tokoferol (Sigma T3376) kullanıldı.

Lipozom peroksidasyonu üzerine antioksidan etkinin tayininde soya L- α -fosfatidilkolini (Tip IV-S; Sigma P3644), L-askorbik asit (Sigma A5960), ferri klorür (Fe_3Cl ; Merck 803945), trikloroasetik asit (TCA; Merck 100810), tiyobarbitürik asit (TBA; Merck 108180), butillenmiş hidroksi toluen (BHT; Fluka 34750), n-butanol (Merck 100988) ve standart olarak 1,1,3,3,-tetraetoksipropan (TEP; Fluka 86570) kullanıldı.

ABTS radikal katyonu ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) giderici aktivitesi tayininde 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu (Fluka 11557), potasyum peroksodisülfat (Merck 105090) ve standart olarak 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks; Fluka 56510) kullanıldı.

DPPH radikali ($\text{DPPH}^{\bullet}$) giderici aktivitesi tayininde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma D9132) ve metanol (Merck 106008) kullanıldı.

Süperoksit radikali giderici aktivitesi tayininde nitroblue tetrazolium (NBT; Fluka 74032), etilendiamin tetraasetik asit ($\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma E5134), ksantin (Fluka 95490), ksantin oksidaz (Sigma X1875) ve potasyum hidroksit (KOH ; Merck 105021) kullanıldı.

Ferri iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli (indirgeyici güç tayini) deneyinde 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ; Merck 110 238), sodyum asetat (Merck

106264), glasiyel asetik asit (Merck 23332325) ve standart olarak demir sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Fluka 44970) kullanıldı.

Amonyum sülfatla çöktürmede amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$; Merck 101217] kullanıldı.

Protein miktar tayininde sodyum karbonat (Na_2CO_3 ; Merck 106398), sodyum potasyum tartarat (Merck 108085), bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Riedel 12849) ve standart olarak sığır serum albumini (Fluka 05470) kullanıldı.

Ekstrenin total fenolik bileşik ve protein miktar tayininde kullanılan Folin ayırıcının hazırlanmasında sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 106672), sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 386521), % 85 H_3PO_4 (Merck 100564), derişik hidroklorik asit (HCl; Merck 100314), lityum sülfat ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Merck 105694) ve brom (Merck 101945) kullanıldı. Fenol bileşiklerinin tayininde standart olarak gallik asit (3,4,5-hidroksibenzoik asit; Sigma G7384) kullanıldı.

Affinite kromatografisinde siyanojen bromür ile aktive edilmiş Sefaroz 4B (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden, Kod. No. 17-0430-01) ve uygun ligantın seçiminde laktoz (Merck 7656), N-asetil-D-galaktozamin (Sigma A2795), 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit (Fluka 73673), 4-nitrofenil- β -Dglukopiranozit (Fluka 73676), 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozit (Fluka 73653), 4-nitrofenil- β -Dgalaktopiranozit (Fluka 73 670) ve ovalbumin (BDH Chemicals, Poole, England, 33008) kullanıldı.

Tamponların hazırlanmasında sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Riedel 04272), sodyum fosfat monobazik (NaH_2PO_4 ; Riedel 04270), sodyum bikarbonat (NaHCO_3 ; Merck 6323), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 ; Merck 4873), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 ; merck 105101), Tris baz (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, T6066), glisin (Merck 500188), sodyum asetat (Merck 106264) ve sodyum klorür (NaCl; Sigma S9625) kullanıldı.

Poliakrilamit jel elektorforezinde agaroz (Sigma A5093), N,N'-metilenbisakrilamit (Fluka 66669), akrilamit (Fluka 01699), sodyum dodesil sülfat (SDS; Sigma L4390), amonyum peroksodisülfat (Merck 101200), tetrametiletildiamin (TEMED; AppliChem A1148), 2-merkapttoetanol (Merck 805740), gliserol (Merck 104093), bromfenolmavisi (Merck 108122), Coomassie brilliant blue R-250 (Fluka 27816), LMW (Low Molecular Weight) kalibrasyon kiti

(Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden, Kod No. 17-0446-01) ve HMW (High Molecular Weight) kalibrasyon kiti (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden, Kod. No. 17-0445-01) kullanıldı.

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **TCA/TBA Ayırıcı**

6 g trikloroasetik asit ve 0,15 g tiyobarbitürik asidin 40 ml 0,25 N HCl'de (1 N HCl'in 4 kez seyreltilmesiyle hazırlandı) hafif ısıtılarak (60 - 70°C'de) çözünmesi ile hazırlandı.

- **50 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7,0)**

6,8045 KH_2PO_4 ve 8,709 g K_2PO_4 600 ml distile suda çözüldü, pH'sı N HCL ve N NaOH ile 7,0'a ayarlandı. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

- **1 mM Stok 1,1,3,3,-Tetraetoksipropan (TEP) Solüsyonu**

24 μl TEP, 1 ml 1N HCl ve 90 ml distile su balon jojeye alındı, 100 ml işaretine kadar su ile tamamlandı. Kapağı kapatıldı ve 50°C'lik su banyosunda 60 dakika ısıtılıp, soğutuldu. Taze hazırlandı.

- **32 μM TEP Çalışma Solüsyonu**

32 μl 1 mM TEP'e 0,968 ml distile su ilave edildi.

- **ABTS^{•+} Stok Çözeltisi**

0,3841 g 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu 50 ml 4,9 mM potasyum peroksodisülfat ve 50 ml distile suda çözüldü. 12 saat karanlıkta bekletildi.

- **75 mM Fosfat Tamponu (pH 7,4)**

2,04135 g KH_2PO_4 ve 8,5176 g NaHPO_4 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı N HCl ve N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

- **1 M DPPH[•] Stok Çözeltisi**

39,43 mg DPPH[•] 60 ml metanolde çözüldü. Hacim 100 ml'ye metanol ile tamamlandı.

- **60 x 10⁻⁵ M DPPH[•] Çalışma Çözeltisi**

6 ml 1 M DPPH[•] stok çözeltisine 94 ml metanol ilave edilmesi ile hazırlandı.

- **FRAP Ayıracı**

2,5 ml 10 mM TPTZ'nin 40 mM HCl'deki çözeltisi,

2,5 ml 20 mM FeCl₃.6H₂O,

25 ml 0.3 M asetat tamponu, pH 3,6, karıştırılması ile hazırlandı.

- **0.3 M Sodyum Asetat Tamponu (pH 3,6)**

3,1 g sodyum asetat.3H₂O 600 ml distile suda çözüldü. Glasiyal asetik asit ilave edilerek pH 3,6'ya ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

3.4.2. Ekstrenin Fenolik Bileşik ve Protein Miktar Tayininde Kullanılan Folin-Ciocalteu Ayıracının Hazırlanması

1500 ml'lik yuvarlak dipli balona 100 g sodyum tungstat (Na₂WO₄.2H₂O), 25 g sodyum molibdat (Na₂MoO₄.2H₂O), 700 ml distile su, 50 ml % 85 fosforik asit ve 100 ml derişik HCl aktarıldı. Geri soğutucu altında 10 saat ısıtıldı ve karışıma 150 g lityum sülfat, 50 ml su ve birkaç damla brom ilave edildi. Bromun fazlasını bertaraf etmek için 15 dakika ısıtıldı, soğutuldu ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

3.4.3. Affinite Kromatografisinde Kullanılan Çözeltiler

- **1 mM HCl Çözeltisi**

8,3 ml derişik HCl'e hacmi 100 ml olana kadar distile su ilave edilerek 1 M HCl çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 1000 kez seyreltilmesiyle 1 mM HCl çözeltisi hazırlandı.

- **0,5 M NaCl İçeren 0,1 M NaHCO₃ Birleştirici Tamponu (Coupling Buffer), pH 8,3**

8,40 g NaHCO₃ 600 ml distile suda çözüldü. 29,22 g NaCl ilave edildi ve hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,5 M NaCl İçeren 0,1 M Sodyum Asetat Tamponu (pH 4,0)**

13,6 g sodyum asetat ve 29,22 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü, pH'sı glasiyal asetik asit ile 4,0'e ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,5 M NaCl İçeren 0,1 M Tris - HCl (pH 8,0)**

12,11 g Tris baz ve 29,22 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı 8,0'e derişik HCl ile ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,5 M NaCl İçeren 0,1 M Sodyum Asetat Tamponu (pH 4,0)**

1,03 g sodyum asetat.3H₂O ve 29,22 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü. Glasiyal asetik asit ilave edilerek pH 4'e ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,5 M NaCl İçeren 50 mM Tris - HCl Tamponu (pH 8,0)**

6,055 g Tris baz ve 29,22 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı 8,0'e derişik HCl ile ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,5 M NaCl İçeren 50 mM Tris - HCl Tamponu (pH 9,0)**

6,055 g Tris baz ve 29,22 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı 9,0'a derişik HCl ile ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,15 M NaCl İçeren 50 mM Glisin - HCl Tamponu (pH 2,9)**

3,75 g glisin ve 8,77 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü, pH'sı derişik HCL ile 2,9'a ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,15 M NaCl İçeren M Tris - HCl Tamponu (pH 8,0)**

121,1 g Tris baz ve 8,77 g NaCl 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı 8,0'e derişik HCl ile ayarlandı. Hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **0,06 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7,4)**

9,072 g KH₂PO₄ ve 11,866 g Na₂HPO₄.2H₂O 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

- **0,006 M Fosfatla Tamponlanmış Serum Fizyolojik (PBS; Phosphate Buffered Saline), pH 7,4**

900 ml % 0,9 NaCl çözeltisine 100 ml 0,06 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ilave edilerek hazırlandı.

3.4.4. Poliakrilamit Jel Elektrophorezinde Kullanılan Çözeltiler

- **Akrilamit Çözeltilisi**

40 g akrilamit ve 1,09 g N, N'-bisakrilamit 60 ml distile suda çözöldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

- **Ayrıştırma (Resolving) Jeli Tamponu (1 M Tris - HCl Tamponu, pH 8,8)**

12,1 g Tris baz 60 ml distile suda çözöldü, pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,8'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

- **Sıkılaştırma (Stacking) Jeli Tamponu (1 M Tris - HCl Tamponu, pH 6,8)**

12,1 g Tris baz 60 ml distile suda çözöldü, pH'sı N HCl veya N NaOH ile 6,8'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

- **% 10 Sodyum Dodesil Sülfat**

10 g SDS 60 ml distile suda çözöldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **% 1 Amonyum Peroksodisülfat**

1 g amonyum peroksodisülfat 60 ml distile suda çözöldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Taze hazırlandı.

- **Örnek Yükleme Tamponu**

4,8 ml distile su,

1,2 ml 1 M Tris - HCl tamponu (pH 6,8),

2,0 ml % 10 SDS,

1,0 ml gliserol,

0,5 ml % 0,5 bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

- **Elektrophorez Yürütme Tamponu (10 x)**

14,4 g glisin, 3 g Tris baz ve 10 g SDS 60 ml distile suda çözöldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,3'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Kullanılmadan önce 10 kez seyreltildi.

3.5. A. vera Yaprak Pulpasının Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi

3.5.1. A. vera Yaprğından Pulpa ve Jel Ekstrelerinin Hazırlanması

1 adet *A. vera* yaprağı yıkandı ve bıçakla ortadan uzunlamasına ikiye ayrıldı. Yatay konumdaki yaprağın üst derisi, boylamasına ve sonra da jeli ikiye ayırıcısına kenara doğru yatay olarak bıçakla kesildi. Bir kaşık yardımıyla jel parankima dokusundan sıyrılarak ayrıldı. Jelden temizlenmiş yaprak kısımları (pulpa) makasla ufak parçalara kesildi ve elde edilen 50 g pulpa 250 ml distile suda, 1 saat kaynatılıp tülbentten süzülerek elde edilen sulu ekstresi düşük basınçta rotaevaporatörde, kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı. Jel blenderin 2. kademesinde 2 dakika parçalandıktan sonra liyofilize edildi. Elde edilen jel (5,05 g) ve ekstre (1,32 g) -20°C’de saklandı. *A. vera* yaprağının ayrılmış jel ve pulpa kısımları Şekil 3-2’de gösterilmiştir.



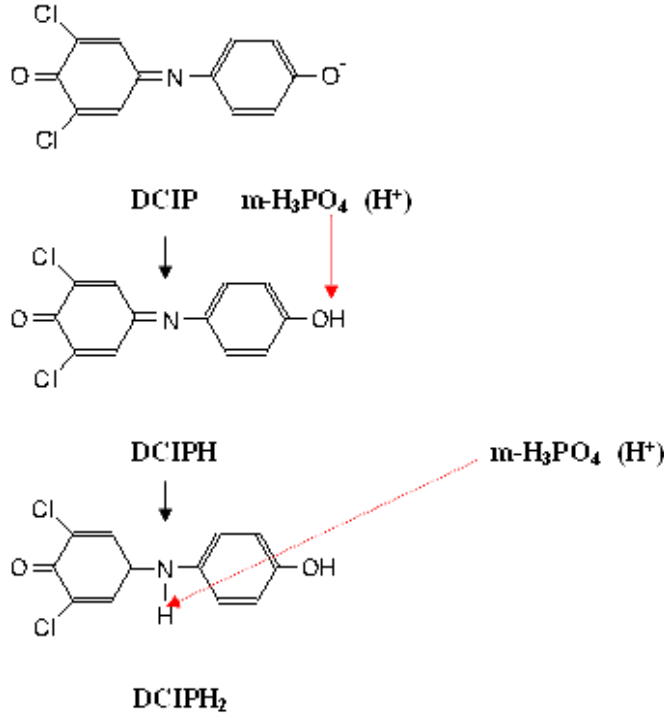
Şekil 3-2: *A. vera* yaprağından jel kısmının ayrılması.

3.5.2. A. vera Yaprak Pulpası Ekstresinde Antioksidan Bileşiklerin Miktar Tayini

3.5.2.1. Askorbik Asit (C Vitamini) Miktar Tayini

Askorbik asit miktarı Omaye ve arkadaşlarının (1971) metoduna göre tayin edildi. Metod askorbik asidin, DCIP boyasını indirgemesi esasına dayanmaktadır. Metafosforik asit mavi olan DCIP boyasını pembe renkli indirgenmiş şekline dönüştürmektedir (DCIPH). Askorbik asit ise meydana gelen pembe renkli DCIPH’ı

renksiz DCIPH₂'ye indirgemektedir. Her DCIP molekülü bir molekül askorbik asit tarafından renksiz şekline dönüştürülmektedir (Şekil 3-3).



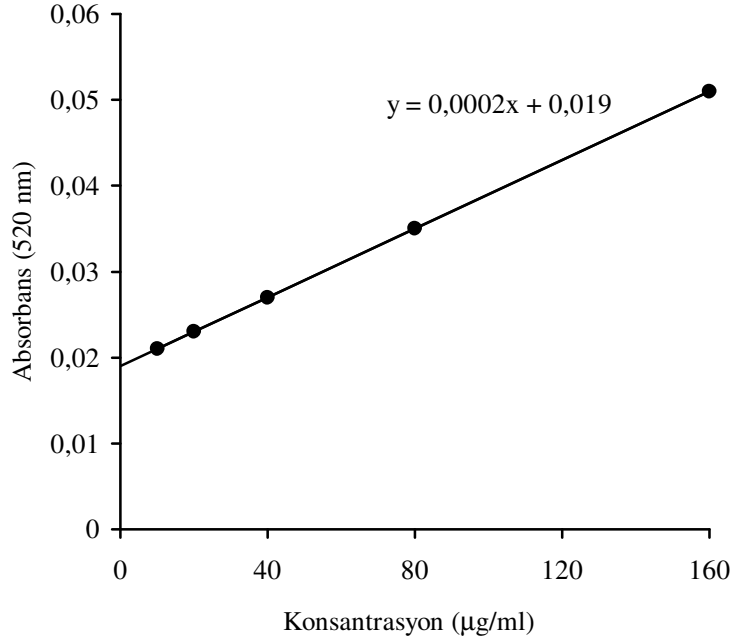
Şekil 3-3: DCIP boyasının indirgenmesi.

25 mg ekstre 5 ml % 1 m-fosforik asit ile 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve Whatman No. 4 filtre kağıdından süzüldü. Süzüntü (2 ml) 1 ml 2,6-diklorofenol-indofenol-sodyum (0,1 mg/ml) ile karıştırıldı ve absorbansı her 15 saniyede 520 nm'de köre karşı spektrofotometrede ölçüldü. Ekstrenin askorbik asit miktarı L-askorbik asit (10 - 160 µg/ml) ile hazırlanan standart eğriden hesaplandı. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Sonuçlar mg askorbik asit/g yaprak pulpası olarak ifade edildi.

3.5.2.2. Askorbik Asit Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Askorbik asit standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce askorbik asidin % 1'lik m-fosforik asitteki 160 µM'lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin % 1'lik m-fosforik asit ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 10 µg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Omaye ve arkadaşlarının metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 520 nm'de % 1'lik m-fosforik asite karşı ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve 0 µM çözeltinin absorbans değerinden

değişik konsantrasyondaki çözeltilerin absorbanlarının çıkarılmasıyla bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla askorbik asidin regresyon denklemi elde edildi ve askorbik asit standart eğrisi çizildi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Askorbik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.5.2.3. β -Karoten (Provitamin A) Miktar Tayini

β -Karoten miktarı Nagata ve Yamashita (1992) metoduna göre tayin edildi. 25 mg ekstre 10 ml aseton - heksan karışımı (4: 6) ile 1 dakika süreyle çalkalandı ve Whatman No.4 filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün absorbansı 453, 505 ve 663 nm’de ölçüldü. β -Karoten miktarı Denklem 3-1’e göre hesaplandı.

$$\beta\text{-Karoten (mg/100 ml)} = 0,216 A_{663} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453} \quad (3-1)$$

β -Karoten miktarı $\mu\text{g } \beta\text{-karoten/g}$ yaprak pulpası olarak ifade edildi. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

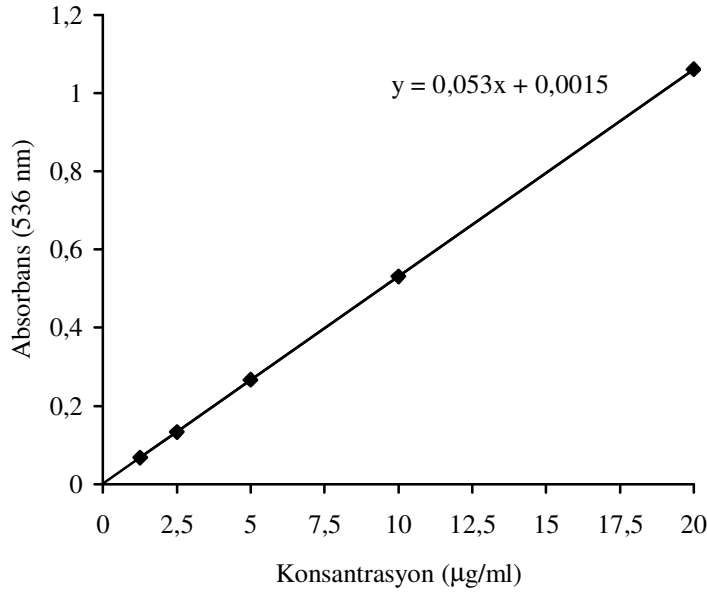
3.5.2.4. α -Tokoferol (E Vitamini) Miktar Tayini

E vitamini tayini Desai (1984) tarafından bildirilen ve α -tokoferol tarafından Fe^{3+} iyonlarının indirgenmesi ile meydana gelen Fe^{2+} 'nin o-fosforik asit varlığında batofenantrolin ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin spektrofotometrik olarak 536 nm'de ölçülmesi esasına dayanan metoda göre yapıldı.

25 mg ekstreye 3 ml % 2'lik pirogallolün % 95'lik etanoldeki çözeltisi ve 1 ml 10 N KOH ilave edilerek karıştırıldı ve 70°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Daha sonra tüpler soğutuldu ve 1 ml distile su ile 3 ml n-heksan ilave edildikten sonra karışım vorteks mikserde karıştırıldı ve 10 dakika 3 000 rpm'de santrifüj edilerek fazlar ayrıldı. n-Heksan fazı alındı ve kuruluğa kadar azot gazı altında uçuruldu. 1 ml absolü etanolde çözülen kuru ekstreye 0,2 ml % 0,2'lik batofenantrolin ilave edildi. Reaksiyon karışımı gün ışığından korunması için renkli şişelerde çalışıldı. Reaksiyon karışımına 0,2 ml 0,0001 M FeCl_3 ve 0,2 ml 0,001 M o-fosforik asit ilave edildi ve vorteks mikserde karıştırıldı. Aynı işlemler α -tokoferol yerine 1 ml absolü etanol kullanılarak kör deneyi yapıldı. Meydana gelen rengin absorbansı köre karşı spektrofotometrede 536 nm'de ölçüldü. Spektrofotometrik kalibrasyon için absolü etanolde çözdürülen α -tokoferol standartı kullanıldı. α -Tokoferol miktarı μg α -tokoferol/g yaprak pulpası olarak ifade edildi. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.2.5. α -Tokoferol Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

α -Tokoferol standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce α -tokoferolün absolü etanoldeki 20 μM 'lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin absolü etanol ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ve 1,25 $\mu\text{g/ml}$ olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Desai deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 536 nm'de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla α -tokoferolün regresyon denklemi elde edildi ve α -tokoferol standart eğrisi çizildi (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: α -Tokoferol standart eğrisi ve regresyon denklemi.

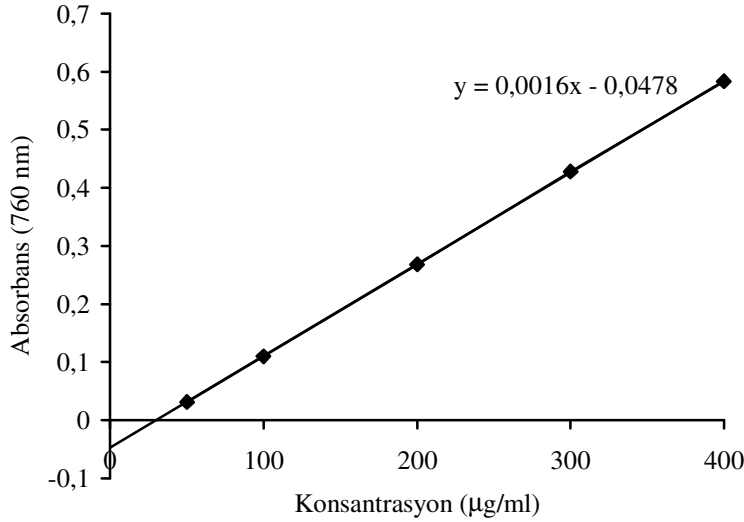
3.5.2.6. Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini

A. vera ekstresinin total fenolik bileşikleri miktarı Folin-Ciocalteu ayırıcı kullanılarak Slinkard ve Singleton'un (1977) geliştirdiği metoda göre tayin edildi. Değişik konsantrasyonlarda (10 - 40 mg/ml) hazırlanan ekstreten 0,1'er ml tüplere alındı ve hacimleri 4,6 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. 0,1 ml Folin-Ciocalteu ayırıcı (distile su ile 1/3 oranında seyreltildi) ve 0,3 ml % 2 sodyum karbonat çözeltisinden ilave edildi, tüpler vorteks mikserde karıştırıldı ve 2 saat bekletildikten sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı ekstrenin yerine 0,1 ml distile su içeren köre karşı 760 nm'de ölçüldü. Gallik asit (50 - 400 µg/ml) ile standart eğri çizildi. Sonuçlar mg gallik asit ekivalanları/g yaprak pulpası olarak ifade edildi. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.2.7. Gallik Asit Standart Eğri Denklemine Elde Edilmesi

Gallik asit standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce gallik asidin 1000 µg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml ve 50 µg/ml olan çözelti elde edildi. Çözeltilere Folin-Ciocalteu metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 760 nm'de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan

değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla gallik asit standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi(Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Gallik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi.

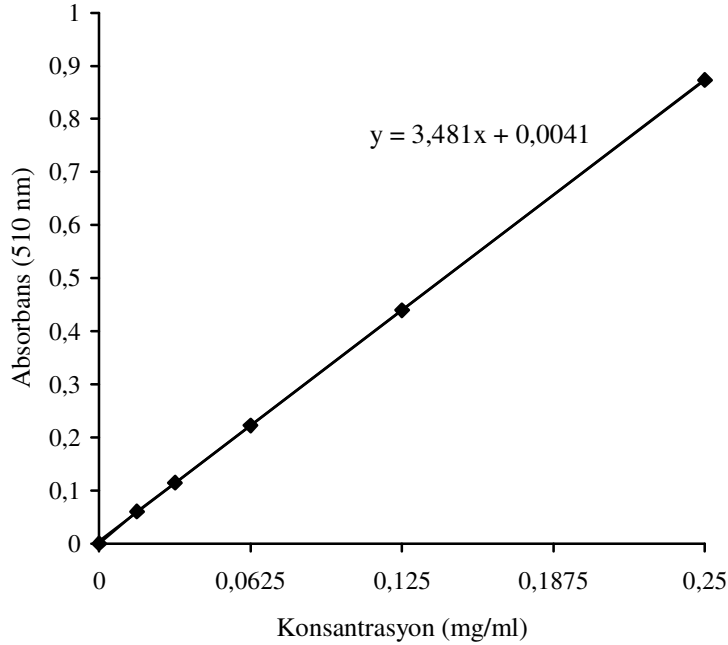
3.5.2.8. Flavonoit Miktar Tayini

Flavonoitlerin miktarı Sakanaka ve arkadaşlarının (2005) geliştirdiği metoda göre yapıldı. 0,25 ml ekstre veya standart olarak kullanılan kateşin çözeltileri 1,25 ml distile su ile karıştırıldı. 75 µl % 5'lik sodyum nitrit ilave edildikten 6 dakika sonra 150 µl % 10'luk alüminyum klorür ilave edildi ve karışım 5 dakika bekletildikten sonra 0,5 ml 1 M sodyum hidroksit ilave edildi. Reaksiyon karışımı 2,5 ml'ye distile su ile tamamlandıktan ve karıştırıldıktan sonra meydana gelen rengin absorbansı 510 nm'de ayıraç körüne karşı ölçüldü. Sonuçlar mg kateşin ekivalanları/g yaprak pulpası olarak ifade edildi. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.2.9. Kateşin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Kateşin standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce kateşinin 0,25 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,125mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,031 mg/ml ve 0,016 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere Sakanaka ve arkadaşlarının (2005) geliştirdiği metod uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 510 nm'de ölçüldü. Deney beş kez

tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla kateşin standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.5.3. A. vera Yaprak Pulpası Ekstresinin Antioksidan Aktivitesinin Tayini

3.5.3.1. A. vera Yaprak Pulpası Ekstresinin Demir (III) - Askorbik Asit ile İndüklenmiş Fosfatidilkolin Lipozomlarının Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisi

Fosfolipitler, gıdalardaki antioksidan bileşiklerin membran lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkisinin tayininde ideal bir model oluşturan ve gıdaların potansiyel antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan çok önemli substratlardır (Chatterjee ve Agarwal 1988).

Bu testin amacı ekstrenin, soya fosfatidilkolininden (lesitinden) hazırlanan lipozomlardan oluşturulan suni lipit sisteminin $FeCl_3$ ve askorbik asit ile inkübasyonu sonucunda oluşan peroksit radikallerini giderme kapasitesini ölçmektir. Fosfolipitlerden oluşturulan lipozomlar, demir (III) ve askorbik asit varlığında lipit peroksidasyonuna uğrarlar ve biyolojik olarak aktif aldehitler (malondialdehit) oluşur. Malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA)'ın reaksiyona girmesiyle oluşan tiyobarbitürik asit

reaktif türleri (TBARS)'nin pembe rengi 532 nm'de ölçülerek ekstrenin lipit peroksidasyonuna karşı inhibisyon aktivitesi tayin edildi.

Ekstrenin lipit peroksidasyonuna karşı inhibisyon aktivitesi Duh ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre yapıldı.

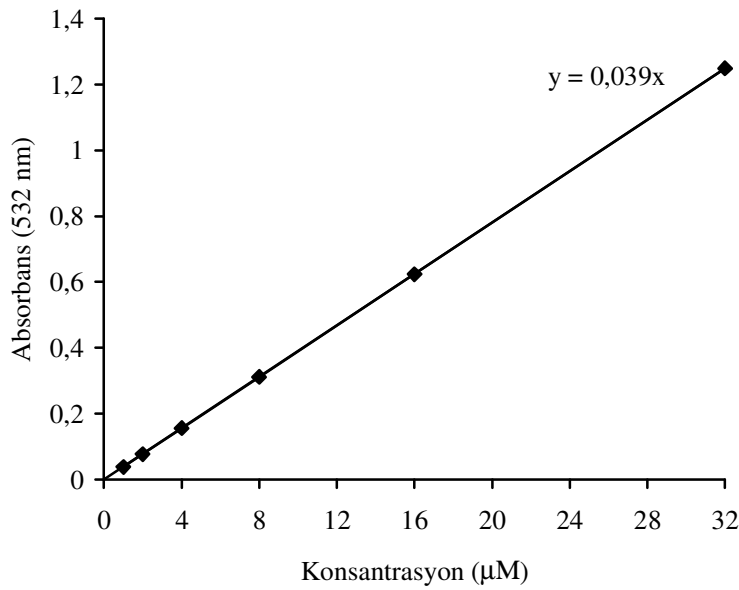
300 mg lesitin 30 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) ile süspansiyon haline getirildi. Lipozomların açığa çıkması için buz içeren kaptaki her 30 saniyede dinlendirilerek toplam 10 dakika sonikatörde muamele edildi (9 cycle/ 26 % power) ve 10 mg/ml fosfolipit lipozomları içeren bir süspansiyon elde edildi. Deney 3,25 ml'lik reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. İlave edilen maddelerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları parantez içinde gösterildi. 0,25 ml ekstre (5 - 60 mg/ml) veya standart olarak kullanılan α - tokoferol (0,02 - 0,31 mg/ml)'e 1 ml 10 mg/ml lipozom süspansiyonu (3,08 mg/ml), 1 ml 400 μ M FeCl₃ (123,2 μ M) ilave edildi ve reaksiyon 1 ml 400 μ M askorbik asit (123,2 μ M) ilavesi ile başlatıldı. Karışım 37°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA metodu ile tayin edildi (Buege ve Aust, 1978). 500 μ l reaksiyon karışımına 1000 μ l TCA - TBA ayırıcı (% 15 w/v TCA ve % 0,375 TBA'nın 0,25 N HCl'deki çözeltisi) ve 14 μ l % 2'lik BHT'nin absolü etanoldeki çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı vortekste karıştırıldı ve 100°C'de 20 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra 1,5 ml n-butanol ilave edildi ve 3 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki organik tabaka alındı. Meydana gelen pembe rengin absorbansı 532 nm'de ölçülerek MDA miktarı 1,1,3,3,-tetraetoksipropan (TEP) kullanılarak hazırlanan standart eğriden veya absorplama kapasitesi ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) değeri kullanılarak lipit peroksitlerin miktarı hesaplandı ve nM TBARS/g lesitin olarak ifade edildi. Ekstrenin lipit peroksidasyonunu inhibe edici yüzdesi Denklem 3-3'e göre hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 532 nm'deki absorbans}_1}{\text{Kontrolün 532 nm'deki absorbans}_1}\right) \times 100 \quad (3-3)$$

EC₅₀ değeri (% 50 TBARS oluşumunun inhibisyonunu sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu) absise antioksidan miktarı, ordinata inhibisyon yüzdeleri verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin linear kısmından elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.3.2. MDA Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

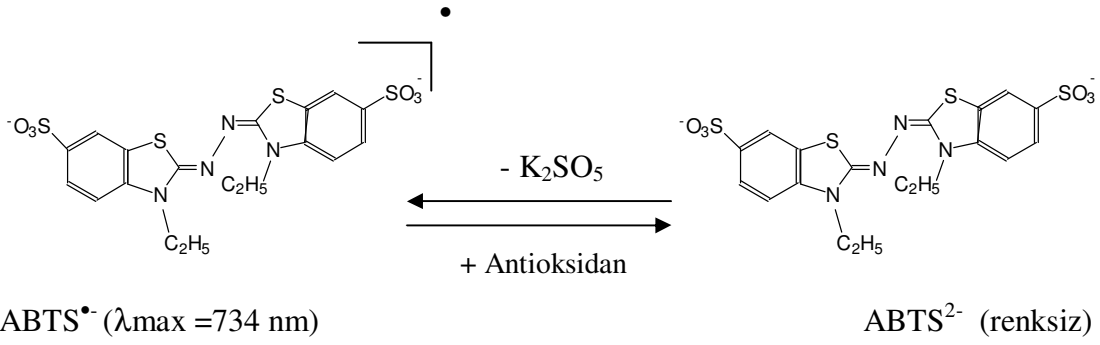
Çalışma standartı olarak 32 µM TEP (MDA) hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 16 µM, 8 µM, 4 µM, 2 µM ve 1 µM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere TBA metodu uygulandıktan sonra meydana gelen pembe rengin absorbansı 532 nm’de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla MDA standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-8).



Şekil 3-8: MDA standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.5.3.3. Troloks Ekvolan Antioksidan Kapasitesi (TEAC) Deneyi

A. vera ekstresinin total antioksidan potansiyeli tayini Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre yapıldı. Bu metod, mavi - yeşil renkli dayanıklı bir bileşik olan ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\bullet+}$)’nun giderilmesi sonucunda, renkte meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. $ABTS^{\bullet+}$, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6sulfonik asit) amonyum tuzu ($ABTS^{2-}$)’nun peroksidisülfatla oksidasyonu sonucu meydana gelir. Huang ve arkadaşları (2005) tarafından şekil halinde gösterilmiştir (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) amonyum tuzunun peroksidisülfatla oksidasyonu sonucu ABTS^{•+} meydana gelişi - Huang ve arkadaşları (2005)'den.

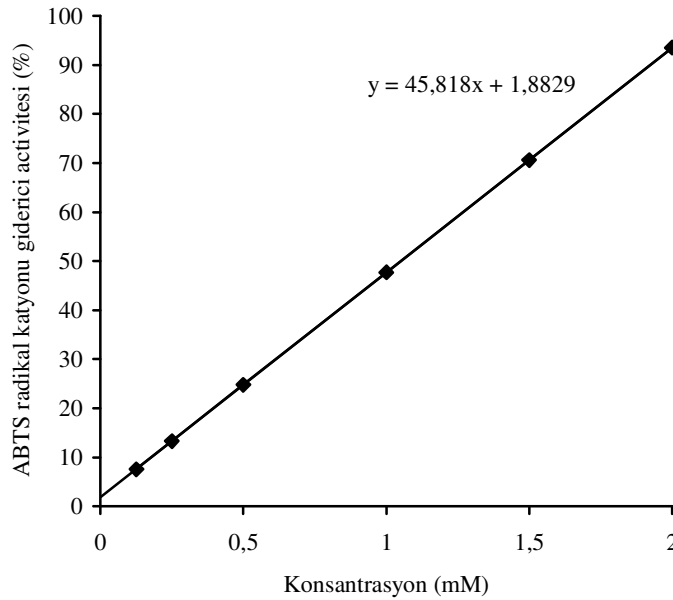
7 mM ABTS amonyum tuzu suda çözüldü ve 2,45 mM potasyum peroksidisülfatla reaksiyona sokularak hazırlanan ABTS^{•+} stok çözeltisi oda sıcaklığında koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlamak için 12 - 16 saat bekletildi. Deney gününde, ABTS^{•+} stok çözeltisi, 734 nm'de absorbansı 0,70 ($\pm 0,02$) olacak şekilde % 96'lık etanol ile seyreltilerek ABTS^{•+} çalışma çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 990 μl 'nin 10 μl *A. vera* ekstresi (5 - 60 mg/ml), α - tokoferol (0,125 - 1 mg/ml), askorbik asit (0,0625 - 0,5 mg/ml) veya Troloks (suda çözünen sentetik vitamin)'a ilave edilmesi ile renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm'de 6. dakikada ölçüldü. Diğer taraftan negatif kontrol deneyleri, ekstre veya standart çözeltileri yerine aynı miktarda % 96'lık etanol kullanılması suretiyle gerçekleştirildi. ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi Denklem 3-4'e göre hesaplandı.

$$\text{ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 734 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 734 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100 \quad (3-4)$$

İnhibisyon yüzdeleri Troloks standart eğrisine ait değerlerle karşılaştırılmasıyla, 1 mM Troloks'un gösterdiği inhibisyon yüzdesine eşdeğer inhibisyon yüzdesi göstermesi için gerekli olan *A. vera* yaprak pulpası ekstresinin konsantrasyonu hesaplandı ve TEAC değeri olarak ifade edildi. Deneyler üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.3.4. Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

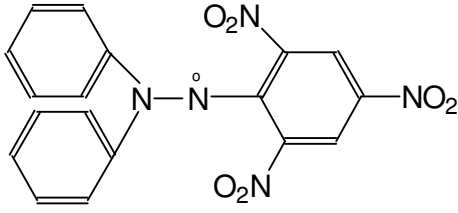
Troloks standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce Troloks'un 10 mM'lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 75 mM'lık fosfat tamponu (pH 7,4) ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM ve 0,125 mM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere TEAC deneyi uygulandıktan sonra renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm'de 6. dakikada ölçüldü ve Troloks'un ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi yüzdeleri hesaplandı. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla Troloks standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.5.3.5. DPPH Radikali Giderici Aktivitesi Tayini

DPPH radikali giderici aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi. Huang ve arkadaşları (2005) en çok kullanılan dayanıklı organik nitrojen radikali olan DPPH•'i şekil halinde göstermiştir (Şekil 3-11).



Şekil 3-11: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) - Huang ve arkadaşları (2005)’den.

0,1 ml ekstre (5 - 60 mg/ml) veya α -tokoferol (0,031 - 0,5 mg/ml) ve askorbik asit (0,008 - 0,25 mg/ml)’e 3,9 ml DPPH[•]’ın metanoldeki çözeltisi (6×10^{-5} M) ilave edildi. Karışım 30 dakika karanlıkta bekletildi. Absorbanslar 517 nm’de spektrofotometrede metanole karşı okundu. Pozitif ve negatif kontroller paralel olarak çalışıldı. Pozitif kontrolde ekstrenin yerine standart (α -tokoferol ve askorbik asit), negatif kontrolde ise çözücü (metanol) kullanıldı. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Antioksidanın EC₅₀ konsantrasyonu (antioksidan numunenin % 50 DPPH radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı), absise antioksidan miktarı, ordinata % DPPH radikali giderici aktivitesi verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kısmından elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı. DPPH radikali giderici aktivitesi Denklem 3-5’e göre hesaplandı.

$$\text{DPPH radikali giderici aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 517nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 517 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100 \quad (3-5)$$

3.5.3.6. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesi Tayini

Süperoksit radikali giderici aktivitesi Aruoma ve arkadaşlarının (1989) geliştirdiği metoda göre tayin edildi. Deney ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi sonucunda oluşan mavi - mor renkli formazonların 560 nm’de absorbanslarının okunması esasına dayanır.

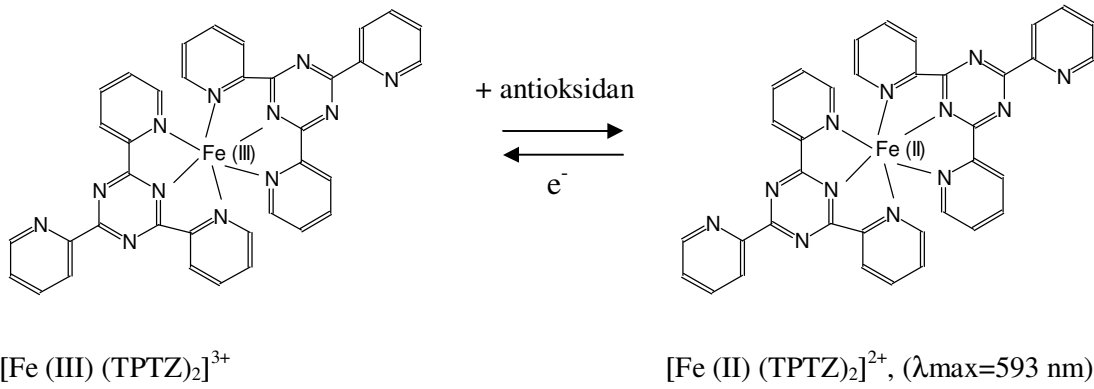
Deney 3 ml’lik reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. İlave edilen maddelerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları parantez içinde gösterildi. 100 μ l ekstre, 100 μ l 30mM EDTA (1 mM), 10 μ l 50 mM KOH’de çözünmüş 30 mM ksantin (0,1 mM), 100 μ l 3 mM NBT (0,1 mM) ve 2,59 ml 57,5 mM KH₂PO₄ - KOH, pH 7,4 (50 mM) karıştırıldı. 100 μ l 1,5 U ksantin oksidaz (0,05 U/ml) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. 10

dakika sonra absorbanslar 560 nm’de köre karşı okundu. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Süperoksit radikali giderici aktivitesi Denklem 3-6’ya göre hesaplandı.

$$\text{Süperoksit radikali giderici aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 560 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 560 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100 \quad (3-6)$$

3.5.3.7. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi

FRAP deneyinde oksidan olarak Fe (III) tuzları $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$ kullanıldı. Bu deneyin esası Huang ve arkadaşları (2005) tarafından şekil halinde gösterilmiştir (Şekil 3-12). Fe (III) tuzlarının redoks potansiyeli $\sim 0,70 \text{ V}$ ’dur ve ABTS radikal katyonunun redoks potansiyeline çok yakındır (0,68 V). Bu nedenle TEAC ve FRAP değerleri genellikle çok yakındır ve iki deneyin arasındaki fark TEAC deneyinin nötral pH’da, FRAP deneyinin ise asidik ortamda (pH 3,6) yapılmasıdır.



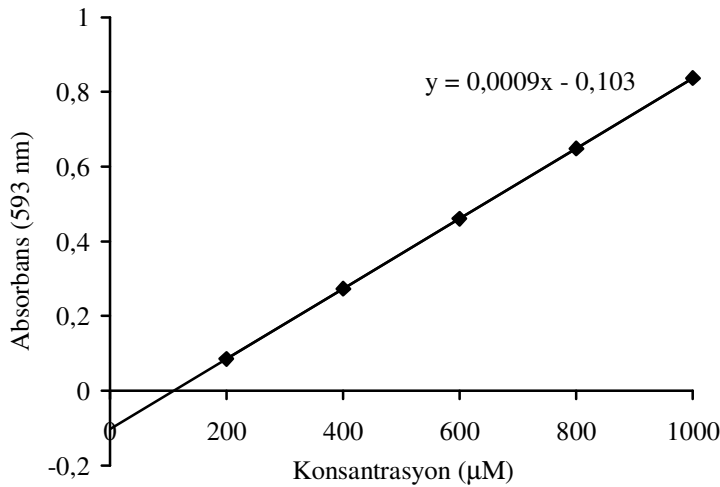
Şekil 3-12: Fe (III) tuzlarının $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$, Fe (II)’ye $[\text{Fe (II) (TPTZ)}_2]^{2+}$ indirgenmesi - Huang ve arkadaşları (2005)’den.

FRAP deneyi Benzie ve Strain (1996) metoduna göre yapıldı. FRAP ayırıcı 2,5 ml 10 mM TPTZ’nin 40 mM HCl’deki çözeltisinin, 2,5 ml 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 25 ml 0,3 M asetat tamponu (pH 3,6)’nın karıştırılması ile hazırlandı. FRAP ayırıcındaki Fe (III) konsantrasyonu 1,67 mM, TPTZ konsantrasyonu ise 0,83 mM’dır. Her gün taze hazırlanan ve 37°C ’de inkübe edilen FRAP ayırıcının 900 μl ’si, 90 μl distile su ve 30 μl ekstre (2,5 - 80 mg/ml) veya standart olarak kullanılan α -tokoferol (0,625 - 1 mg/ml) ve askorbik asit (0,031 - 0,5 mg/ml) (kör hazırlanırken distile su) ile karıştırılarak

absorbans artışı 4. dakikada 593 nm’de spektrofotometrede ayıraç körüne karşı ölçülür. Ekstrenin ΔA_{593nm} değeri, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (200 - 1000 μM) ile hazırlanan standart eğrisine ait ΔA_{593nm} değerlerle karşılaştırılmak suretiyle FRAP değeri (mM/L Fe^{2+}), 1 mM Fe (III)’ün Fe (II)’e indirgenmesi olarak ifade edildi. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.3.8. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ’ın 1000 μM ’lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 800 μM , 600 μM , 400 μM ve 200 μM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere FRAP deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 4. dakikada 593 nm’de köre karşı ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-13).



Şekil 3-13: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.5.4. İstatiksel Değerlendirme

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde Student’s t testinden yararlanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi. Değişkenler arasındaki ilişki ise kolerasyon analizi ile değerlendirildi.

3.6. A. vera Yaprak Pulpasından Lektin Elde Edilmesi

3.6.1. Ham Ekstrenin Hazırlanması

8 adet *A. vera* yaprağının (toplam ağırlık 2168,9 g, ortalama yaprak ağırlığı 271,1 g) jelden temizlenmiş yaprak kısmı (499,96 g) makasla ufak parçalara kesildi ve blender ile 800 ml PBS’de homojenize edildi. Homojenat manyetik karıştırıcı ile, soğuk dolapta 30 dakika karıştırılıp bir gece buzdolabında bekletildi. Homojenat ertesi gün tülbentten süzildükten (450 ml) sonra 6 000 rpm’de 4°C’de 30 dakika santrifüje edildi. Çökelti atıldı ve üstteki berrak sarı renkli sıvı (430 ml) *A. vera* yaprak pulpası **ham ekstresi** olarak adlandırıldı.

3.6.2. A. vera Yaprak Pulpası Ham Ekstresinden Lektinin % 50 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

Ham ekstreye ortamdaki konsantrasyonu % 50 olacak şekilde havanda toz haline getirilmiş amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi ve soğuk dolapta manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan sonra 4°C’de bir gece bekletildi, böylece proteinlerle birlikte lektinin çökmesi sağlandı. Ertesi gün karışım 4°C’de 6 000 rpm’de, 30 dakika santrifüje edildi. Çökelti, çözünebileceği en az miktardaki PBS ile çözüldü ve 4°C’de PBS’e karşı dializ edildi. Çözünmemiş katı partikülleri uzaklaştırmak üzere çözelti tekrar 4°C’de 6 000 rpm’de, 30 dakika santrifüje edildi. Supernatant (56 ml) **% 50 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı, hemaglutinasyon aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra affinite kolon kromatografisine uygulandı.

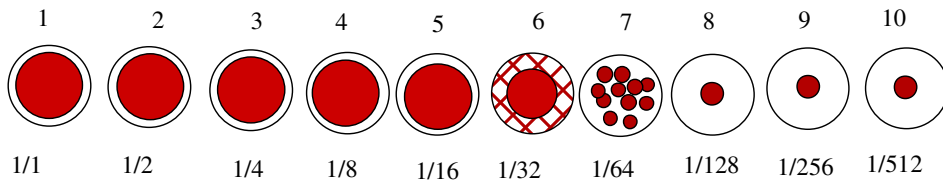
3.6.3. % 4’lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması

2 – 3 kg’lık bir tavşanın kulak venasından 2 ml kan, 6 mg sodyum oksalat içeren dereceli tüpe aktarıldı, 3 ml PBS, pH 7,4 ilave edilerek 2 300 rpm’de 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işlemi üstteki sıvı renksiz olana kadar tekrarlandı. Çöken eritrosit hacmi ml olarak okundu. % 4’lük eritrosit süspansiyonunu hazırlamak için Denklem 3-7’den yararlanıldı (Lis ve Sharon 1972).

$$\text{Total hacim} = \frac{\text{Çöken eritrosit hacmi}}{\text{İstenen \% eritrosit konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3-7)$$

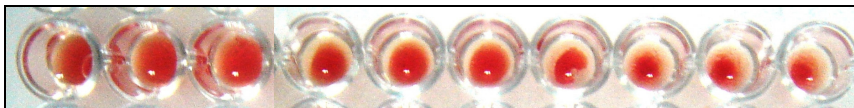
3.6.4. Hemaglutinasyon Aktivitesi Tayini

Hemaglutinasyon aktivitesini ölçmek için, seri halinde yarı yarıya seyreltme yöntemi kullanıldı (Kabat ve Mayer 1964, Kaynak: Malkoç 1997). Seyreltmeler bazı deneylerde mikrotitrasyon plaklarında 25 µl'lik, bazı deneylerde ise 10 x 75 mm boyutlarındaki 10 adet tüpte 0,5 ml'lik hacim içinde yapıldı. Deney mikrotitrasyon plağında yapılırken, ilk kuyucuğa 50 µl örnek (lektin çözeltisi), diğer 9 kuyucuğa 25'er µl PBS çözeltisi mikropipet ile kondu. Birinci kuyucuktan 25 µl çözelti alınarak ikinci kuyucuğa aktarıldı. Pipet birkaç kez bu kuyucuktaki çözelti ile yıkandıktan sonra, ikinci kuyucuktan 25 µl çözelti alındı ve üçüncü kuyucuğa aktarıldı. İşlemlere bu şekilde onuncu kuyucuğa kadar devam edildi. Onuncu kuyucuktaki çözeltinin 25 µl'si dışarı atıldı. Böylece, kuyucuklardaki lektinin (örnek) seyreltme oranları sırasıyla 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64; 1: 128, 1: 256 ve 1: 512 oldu. Seyreltmeler tamamlandıktan sonra, her kuyucuğa tavşan kulak venasından alınan kanın, PBS ile hazırlanmış, % 4'lük eritrosit süspansiyonundan (Liener ve Hill 1952) 25'er µl kondu. İnce bir bagetle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün, yine ince bagetle hafifçe karıştırılarak, hemaglutinasyon aktivitesi, en fazla aglutinasyon (+++) ve aglutinasyon olmayan kuyucuk (-) olmak üzere gözle (Şekil 3-14 ve 3-15) ve sonra ışık mikroskobu altında değerlendirilerek saptandı (Şekil 3-16).

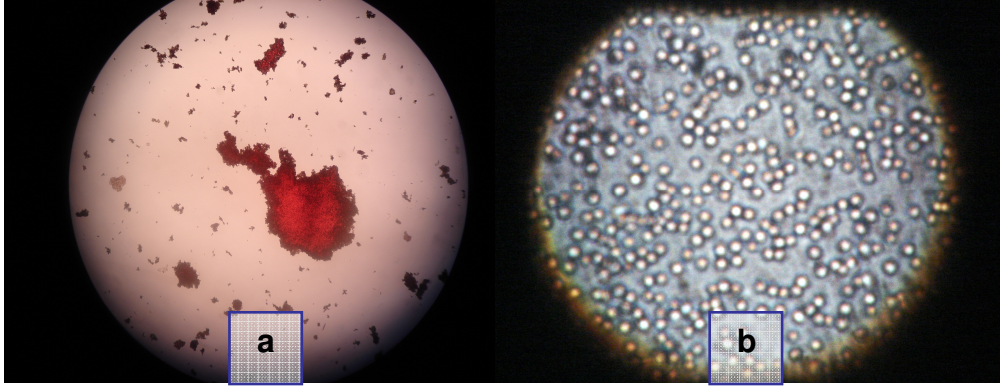


Şekil 3-14: Mikrotitrasyon plaklarında hemaglutinasyonun gözle değerlendirilmesinin şematik gösterimi.

Kuyucukların numaraları üstte, kuyucuklardaki seyreltme oranları altta gösterilmiştir. 1 - 5 No'lu kuyucuklarda hemaglutinasyon +++, 6 No'lu kuyucukta ++, 7 No'lu kuyucukta +, 8-10 No'lu kuyucuklarda ise - ile gösterilir.



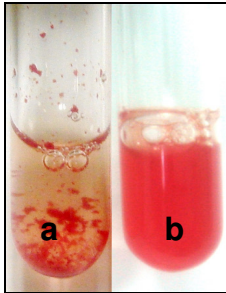
Şekil 3-15: Hemaglutinasyon mikrotitrasyon plağında görünümü.



Şekil 3-16: Hemaglutinasyonun aydınlık saha (normal ışık) mikroskopunda lam - lamel arasındaki görünümü.

a) +++ Hemaglutinasyon (M.B. 40x10), b) – Hemaglutinasyon (normal eritrositler) (M.B. 60x10)

Tüplerde yapılan hemaglutinasyon deneylerinde, ilk tübe 1 ml lektin çözeltisi (örnek) ve diğer 9 tübe 0,5'er ml PBS konularak seri halinde yarı yarıya seyreltme metodu uygulandı. Seyreltmelerden sonra tüplere, % 4'lük eritrosit süspansiyonundan 0,2'şer ml ilave edildi. Oda sıcaklığında bir gece bekletildi ve tüplerin alt kısmına parmakla hafifçe vurulmak suretiyle hemaglutinasyon aktivitesi (Lis ve Sharon 1972) aynı şekilde gözle değerlendirildi (Şekil 3-17).



Şekil 3-17: Hemaglutinasyonun tüplerde görünümü.

a) +++ Hemaglutinasyon, b) – Hemaglutinasyon.

3.6.5. Hemaglutinasyon Aktivitesinin Hesaplanması

Bir hemaglutinasyon birimi (HB), deney koşullarında belirgin (++) hemaglutinasyon aktivitesi gösteren en az lektin miktarı olarak tanımlandı ve Denklem 3-8'e göre hesaplandı (Liener ve Hill 1952).

$$HB / mg = \frac{D_a \times D_b \times S}{V} \quad (3-8)$$

V) 1. kuyucuktaki lektin çözeltisinin hacmi (ml)

D_a) 1. kuyucuktaki lektin çözeltisinin seyreltme oranı (hiç seyreltilmemiş lektin çözeltisi, 1: 1)

D_b) 1 HB aglutinasyon aktivitesi gösteren kuyucuktaki lektin çözeltisinin seyreltme oranı.

S) 1. kuyucuktaki mg/ml lektin (protein) miktarı.

3.6.6. Protein Miktar Tayini

Lektin saflaştırma aşamalarında elde edilen çözeltilerde protein miktar tayinleri Lowry yöntemine göre gerçekleştirildi (Lowry ve ark. 1951).

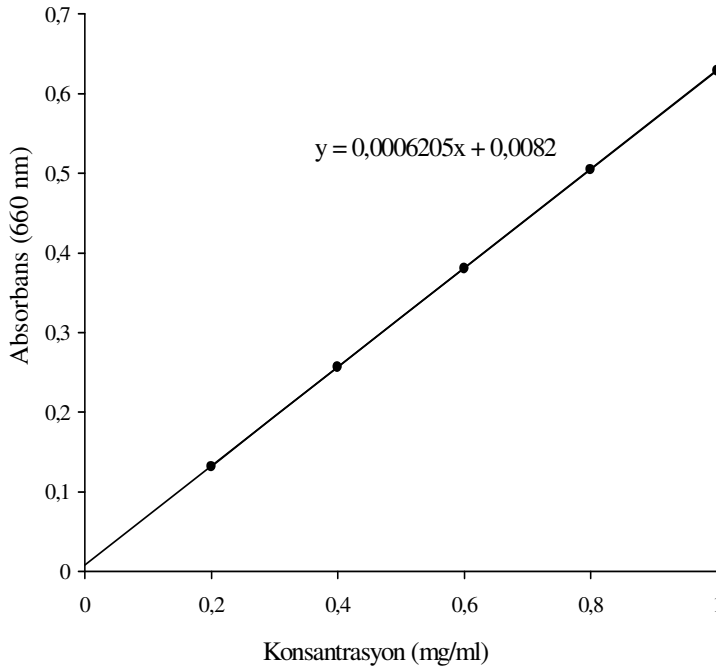
Ayıraçlar

- | | | | |
|------------------|---|---|-------|
| 1- A Ayıracı | : | % 2 Na ₂ CO ₃ çözeltisi (0,1 N NaOH'te) | |
| 2- B Ayıracı | : | % 2 Na - K tartarat çözeltisi | 1 ml |
| | | % 1 CuSO ₄ | 1 ml |
| | | A Ayıracı | 98 ml |
| 3- Folin Ayıracı | : | 2N Folin Ayıracı (Folin ve Ciocalteu 1927). | |

Bir deney tübüne 100 µl örnek alındı. Üzerine 100 µl distile su ve 2 ml B ayıracı ilave edildi. On dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 100 µl Folin ayıracı eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta, 45 dakika bırakıldı. Oluşan mavi-mor renkli çözeltinin 660 nm'deki absorbansı, ayıraç körüne karşı spektrofotometrede okundu. Bu absorbans değerinin, sığır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı mg/ml olarak belirlendi.

3.6.7. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 1 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml ve 0,8 mg/ml olan çözelti elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Lowry deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-18).



Şekil 3-18: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemleri.

3.6.8. Affinite Kromatografisi

Affinite kromatografisi gözenekli ve inert taşıyıcının aktivasyonu, taşıyıcıya ligantların kovalent bağlanması ve kolon kromatografisi işlemlerini kapsar.

3.6.8.1. Lektinin Özgül Karbohidrat Biriminin Belirlenmesi

Lektinin özgül karbohidrat biriminin belirlenmesinde inhibisyon testinden yararlanıldı. Bu testte, lektine özgü karbohidrat birimi ortama ilave edildiğinde lektine hızla bağlanır ve böylece aglutinasyon inhibe olur. Akev ve Can'ın (1999) belirttiğine göre *A. vera* lektininin monosakkaritler tarafından inhibe edilmediği göz önünde bulundurularak disakkaritler ve glikoproteinler denendi.

A. vera yaprak pulpasında bulunan lektinin özgül karbohidrat biriminin seçimi 10 x 75 mm boyutlarındaki tüplerde yapıldı. Tablo 3-1'de gösterilen karbohidratlar veya glikoproteinlerin PBS'deki çözeltilerinden 250 µl alındı ve 500 µl ham ekstre ilave edildi. Karışım bir gece 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra tüplere, % 4'lük eritrosit süspansiyonundan 250'şer µl ilave edildi ve 2. saatte hemaglutinasyon aktivitesi tüplerin alt kısmına parmakla hafifçe vurulmak suretiyle gözle değerlendirildi.

Tablo 3-1: Lektinin özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivitesi sonuçları.

Karbohidrat/glikoprotein	Hemaglutinasyon aktivitesi
500 mM Laktoz	+
100 mM N-asetil-D-galaktozamin	±
50 mM 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit	+
50 mM 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozit	+
50 mM 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozit	+
50 mM 4-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit	+
50 mg/ml ovalbumin	—

N-asetil-D-galaktozamin Akev ve Can'ın (1999) belirttiği gibi zayıf bir inhibisyon yaptığından ve sadece bir glikoprotein olan ovalbumin içeren tüpte hemaglutinasyon aktivitesi gözlenmediğinden affinite kromatografisi için uygun ligant olarak ovalbumin seçildi.

3.6.8.2. Siyanojen Bromür (CNBr) ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B Jelinin Hazırlanması

- 1 mM HCl çözeltisi (~ 200 ml/g jel) ve 0,5 M NaCl içeren 0,1 mM NaHCO₃, pH 8,3 birleştirici tamponu (coupling buffer) hazırlandı ve 4°C'de saklandı.
- 5 g Sefaroz 4B tartıldı (0,3 g ~ 1ml şişmiş jel hacmi sağlamaktadır) ve 1 mM HCl'de 1 saat bekletilerek şişmesi sağlandı. Düşük hızda çalkalayıcıda karıştırıldı, supernatant uzaklaştırıldı.
- Şişmiş jel, 15 jel hacmi soğuk 1 mM HCl ile yıkandı. Düşük hızda çalkalayıcıda karıştırıldı, supernatant uzaklaştırıldı. İşlem 3 kez tekrarlandı.
- Şişmiş jel, 15 jel hacmi 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3 birleştirici tamponu ile yıkandı. Düşük hızda çalkalayıcıda karıştırıldı, supernatant uzaklaştırıldı. İşlem 3 kez tekrarlandı.

3.6.8.3. Ligantın (Ovalbumin) Siyanojen Bromür ile Aktive Edilmiş Sefaroz 4B Jeline Bağlanması

- 50 mg/ml ovalbumin 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3 birleştirici tamponunda çözüldü.
- 1 hacim yıkanmış jel 5 hacim ligant ile karıştırıldı ve 24 saat 4°C’de düşük hızda jelin çökmesini önlemek için çalkalayıcıda karıştırıldı.

3.6.8.4. Jelde Açıkta Kalan Aktif Grupların Bloke Edilmesi ve Jelin Yıkılması

- Jel 0,1 M Tris - HCl tamponunda, pH 8,0 oda sıcaklığında 2 saat düşük hızda çalkalayıcıda karıştırılarak bekletildi.
- Jel üç kez pH’sı yüksek ve düşük olan aşağıdaki tamponlarla yıkandı:
0,5 M NaCl içeren 0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 4,0.
0,5 M NaCl içeren 0,1 M Tris - HCl tamponu, pH 8,0.
- Son olarak jel, 15 jel hacmi PBS, pH 7,4 ile yıkandı.

3.6.8.5. Lektinin Jele Bağlanması ve Kolondan Elüsyonu

- 176 ml % 50 amonyum sülfat kesiti CNBr - Sefaroz 4B - ovalbumin jeline ilave edildi ve bir gece 4°C’de düşük hızda jelin çökmesini önlemek için çalkalayıcıda karıştırıldı.
- Ertesi gün 1,5 x 30 cm boyutlarındaki kolona, 16 cm yüksekliğe kadar dolduruldu ve PBS ile yıkandıktan sonra lektin - ovalbumin 0,15 M NaCl içeren 0,05 M glisin - HCl, pH 2,9 tamponu ile elüe edildi. Elüatlar, 75 ml/saat akış hızı ile 2,5 ml’lik hacimler halinde, elüatın pH’sını nötralleştirmek için 1,25 ml 0,15 M NaCl içeren M Tris - HCl, pH 8,0 içeren tüplerde toplandı. Elüatların 280 nm’deki absorbansları okunarak elüsyon grafiği çizildi. Her tüpten 0,5’er ml alınıp, 10 x 75 mm boyutlarındaki tüplere aktarıldı ve 0,2’şer ml % 4’lük eritrosit süspansyonu ilave edilerek hemaglutinasyon aktivitesi gösterip göstermediği gözle saptandı.
- Protein pikine rastlayan ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren tüplerdeki çözeltiler birleştirildi (30 ml). PBS’ye karşı 4°C’de dializ edildi ve ultrafiltrasyon membranından geçirilerek konsantre edildi (3 ml).

3.6.9. Poliakrilamit Jel Elektrophorezi (PAGE)

Poliakrilamit jeli akrilamit ve bisakrilamit molekülleri arasında, amonyum peroksodisülfat (APS) aracılığıyla TEMED'in katalizörlüğünde çapraz bağların oluşması ile polimerleşen bir jeldir. Akrilamit ve bisakrilamit arasındaki oran, çapraz bağlarla oluşan porların çapını ve dolayısıyla jelin rezolüsyonunu belirler (19: 1; 29: 1; 39: 1).

Saflaştırılan enzimin saflığı doğal ve SDS'li poliakrilamit jel elektrophoreziyle kontrol edildi.

Saf lektinin ve altbirimlerinin molekül ağırlığı vertikal jel elektrophorezi cihazında, Laemmli metoduna göre yapıldı (Laemmli 1970).

3.6.9.1. Doğal Poliakrilamit Jel Elektrophorezi (Native PAGE)

Doğal poliakrilamit jel elektrophorezi 50 ml'lik bir Falkon tüpü içerisinde aynı konsantrasyon ve pH'da jel hazırlandı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: % 7,5'lik poliakrilamit jelinin hazırlanması.

Ayrıraçlar	% 7,5'lik poliakrilamit jelin hazırlanması
% 40 (w/v) akrilamit, % 1,09 (w/v) N, N'-bisakrilamit (38: 1; w: w)	7,5 ml
Elektrophorez yürütme tamponu	7,5 ml
% 0,5 Amonyum peroksodisülfat	2,5 ml
Distile su	22,5 ml
TEMED	60 µl
Toplam	40 ml

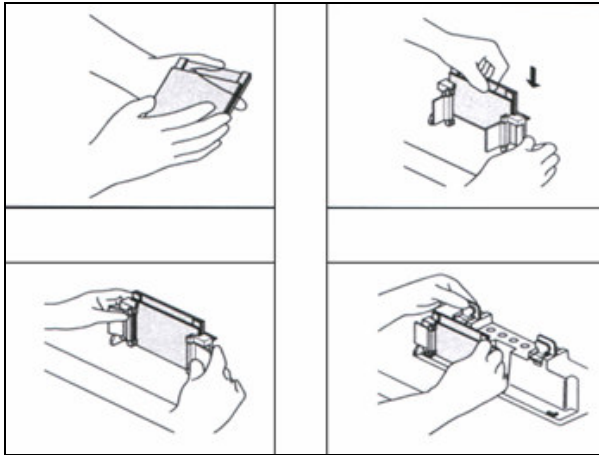
Doğal PAGE için protein örnekleri ısıtılmadan, SDS ve 2-merkaptotanol içermeyen yükleme tamponu ile 1: 1 oranında karıştırıldı.

3.6.9.2. Sodyum Dodesil Sülfatlı Poliakrilamit Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)

Bu metod proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemede ve saflaştırılmış proteinlerin saflık derecelerinin tayininde de kullanılmaktadır (Weber ve Osborn 1969). Proteinler SDS varlığında jel üzerinde yürütüldü. SDS proteinlerin hidrofobik bölgelerini bağlayarak denatüre eder. SDS ayrıca denatüre olmuş proteinleri yüksek

miktarda negatif yükle yükler. Bu yük normalde proteinler üzerinde bulunan yükleri maskeler ve proteinler jel üzerinde yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar (Öner ve Akev 1979). Eğer protein alt birimleri disülfür bağları ile bir arada tutuluyorsa, bu bağlar elektroforezden önce 2-merkaptotanol ve ısı aracılığı ile kırılmalıdır. Her bir proteini ve proteinlerin alt birimlerini jel üzerinde tek bant oluşturacak şekilde ayırt etmek mümkündür.

1. Cam tabakalar önce % 70'lik etanol ve sonra distile su ile temizlenerek oda sıcaklığında kurutuldu.
2. Kısa cam plaka bize doğru bakacak şekilde geniş cam plakanın üzerine yerleştirildi. Cam plakalar arasında 0,75 mm kalınlığında “spacer” adı verilen boşluk oluşturucular konuldu. Plakalar plaka tutturucuları ile kilitlendi ve Pasteur pipeti yardımıyla cam plaka kenarlarının spacer ile yaptığı dış boşluklar agaroz çözeltisi konularak kapatıldı. Oluşturulan jelsiz cam plaka sistemi dik bir vaziyette yerleştirildi (Şekil 3-19).



Şekil 3-19: Vertikal (dikey) jel elektroforez cam plaka sisteminin hazırlanışı.

SDS-PAGE elektroforez sisteminde iki tip tampon ve iki farklı jel konsantrasyonu kullanıldı. Sistemin alt kısmına pH'sı 8,8 olan ve % 12,5 akrilamit jeli içeren ayrıştırma (resolving) jeli, üst kısmına ise pH sı 6,8 olan ve % 4,5 akrilamit içeren sıkılaştırma (stacking) jeli döküldü (Rybicki ve Purves 1996, İçinde: Coyne ve ark. 1996).

3. 50 ml'lik Falkon tüpü içerisinde önce ayırım yapılacak jel tabakası hazırlandı (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: 0,25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5'lik ayırıştırma jelinin hazırlanması.

Ayıraçlar	0,25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5'lik ayırıştırma jelinin hazırlanması
% 40 (w/v) akrilamit, % 1,09 (w/v), N, N'-bisakrilamit (38: 1; w: w)	9,4 ml
1 M Tris - HCl, pH 8,8	7,5 ml
% 10 SDS	0,3 ml
% 1 Amonyum peroksodisülfat	0,5 ml
Distile su	12,3 ml
TEMED	20 µl
Toplam hacim	30 ml

4. 10 ml'lik pipet aracılığı ile jel karışımı cam plakalar arasına döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jel daha polimerize olmadan üzerine su ile doyurulmuş butanol ilave edildi ve jel en az 30 dakika kadar oda sıcaklığında polimerize olması için bırakıldı. Jelin polimerize olduğundan emin olduktan sonra üzerindeki butanol tabakası su ile yıkanarak süzgeç kağıdı yardımıyla kurulandı ve jel yapımında ikinci adım olan sıkılaştırma jelinin yapımına geçildi (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: 0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5'lik sıkılaştırma jelinin hazırlanması.

Ayıraçlar	0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5'lik sıkılaştırma jelin hazırlanması
% 40 (w/v) akrilamit, % 1,09 (w/v) N, N'-bisakrilamit (39: 1; w: w)	1,70 ml
1 M Tris - HCl, pH 6,8	1,90 ml
% 10 SDS	0,15 ml
% 1 Amonyum peroksodisülfat	0,50 ml
Distile su	10,80 ml
TEMED	20 µl
Toplam hacim	15,0 ml

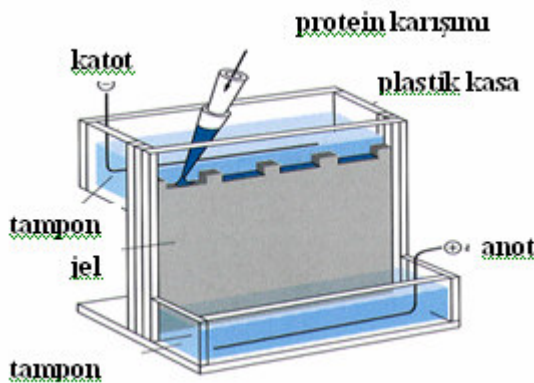
50 ml'lik Falcon tüpü içerisinde hazırlanan karışım yukarıda hazırlanan ayırıştırma jelinin üzerine döküldü ve kuyucukları oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı. Bu tarak 12 adet diş içerir ve bu dişlerin bulunduğu kısımlar polimerizasyondan sonra jel üzerinde kuyucuk olarak kalır. Dişlerin kalınlığı ile cam plakalar arasındaki boşluğun kalınlığının aynı olmasına dikkat edildi. Jelin polimerleşmesi için en az 30 dakika beklendi.

3.6.9.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Denatüre edici SDS-PAGE'de 950 µl örnek yükleme tamponuna (0,125 mM Tris - HCl, % 2 SDS, % 10 gliserol, % 0,02 bromfenol mavisi) 50 µl 2-merkaptetanol ilave edildi ve protein örnekleri ile 1:1 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika ısıtıldı.

3.6.9.4. Jelin Yürütülmesi

Altta spacer çıkartıldı. Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine özenle yerleştirildi. Her iki tank bölmesi elektroforez yürütme tamponu (192 mM glisin; % 0,1 SDS; 25 mM Tris baz içeren elektroforez tamponu, pH 8,3) ile dolduruldu. Mikropipet kullanılarak 25'er µl ham ekstre ve affinite kromatografisi ile saflaştırılan lektin çözeltisinden Şekil 3-20'de görüldüğü gibi kuyucuklara tatbik edildi. Jel 100 ile 120 volt arasında bir voltaj seçilerek jel başına 5 mA akım geçirildi. Bromfenol mavisi, ayırıştırma jelinin alt kısmına gelene kadar elektroforeze 3 - 4 saat devam edildi.



Şekil 3-20: Vertikal jel elektroforezi düzeneği - Lehninger ve arkadaşları (1993)'den.

3.6.9.5. Proteinlerin Jel Üzerinde Görünür Hale Getirilmesi - Jelin Boyanması

Cam plakalar arasından çıkartılan jel % 0,2' lik Coomassie brilliant blue R-250'nin metanol: su: asetik asit (45: 45: 10; v/v) karışımındaki çözeltisinde bir gece çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletildi. Jel, boyandıktan sonra bir spatül yardımıyla boya içerisinden alınarak metanol: su: asetik asit (25: 65: 10; v/v) karışımından oluşan dekoloran çözeltide, çözelti sık sık değiştirilerek, bekletildi. Buradan alınan jeller asetik asit: metanol: su (10: 5: 85; v/v) karışımı içeren kapta saklandı.

3.6.10. Molekül Ağırlığı Tayini

Proteinlerin SDS'li ortamda poliakrilamit jel elektroforezi yönteminde saptanan fraksiyonlarının sayısından altbirim sayısı anlaşılacağı gibi, aynı zamanda altbirimlerin molekül ağırlıkları da tayin edilebilir.

Dekolorasyondan sonra bromfenol mavisinin göç ettiği mesafeye kadar jellerin uzunlukları ve protein bantlarının yerleri cm olarak ölçüldü. Buradan, Denklem 3-9'a göre protein fraksiyonlarının mobilite (Rf)'leri hesaplandı.

$$\text{Mobilite} = \text{Protein göçme uzaklığı} / \text{Bromfenol mavisi göçme uzaklığı} \quad (3-9)$$

Bu yöntemle molekül ağırlığı tayininde, molekül ağırlıkları belli olan altı proteinin mobiliteleri ile molekül ağırlıklarının logaritmaları arasında grafik çizildi. Molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin mobilite değeri grafikte yerine konarak tekabül eden molekül ağırlığı bulundu.

LMW proteinleri içeren karışım (Tablo 3-5) 200 µl denatüre edici yükleme tamponunda çözüldü, 8 µl tatbik edildi.

Tablo 3-5: Marker olarak kullanılan düşük molekül ağırlıklı (LMW) proteinlerin Mr (Da) ve Rf değerleri.

Protein	Mr(Da)	Rf
Fosforilaz	97 000	0,07
Albumin	66 000	0,13
Ovalbumin	45 000	0,25
Karbonik anhidraz	30 000	0,46
Tripsin inhibitör	20 000	0,67
α-Laktalbumin	14 000	0,89

4. BULGULAR

4.1. *A. vera* Ekstresinin Antioksidan Bileşiklerinin ve Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi

4.1.1. *A. vera* Ekstresinin Antioksidan Bileşiklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada *A. vera* ekstresi 50 g yaprak pulpasından hazırlandı ve 0,0264 g/g yaprak pulpası ekstre edilebilen madde miktarı elde edildi.

A. vera yaprak pulpasında antioksidan aktiviteye sahip askorbik asit ($0,422 \pm 0,029$ mg/g yaprak pulpası), β -karoten ($15,51 \pm 2,39$ μ g/g yaprak pulpası), α -tokoferol ($1,47 \pm 0,11$ μ g/g yaprak pulpası), fenolik ($0,241 \pm 0,014$ mg/g yaprak pulpası) ve flavonoit ($0,245 \pm 0,005$ /mg yaprak pulpası) gibi bileşiklerinin miktarı saptandı (Tablo 4-1).

A. vera ekstresinin fenol ve flavonoid bileşiklerinin miktarı arasında yüksek korelasyon ($r^2 = 0,9939$) gözlemlendi.

A. vera sulu ekstresinin konsantrasyona bağlı olarak lipid peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri, MDA, TEAC ve FRAP değerleri Tablo 4-2’de, α -tokoferolünkiler Tablo 4-3’de ve askorbik asidinkiler Tablo 4-4’de gösterildi. *A. vera* ekstresinin ve standartların antioksidan aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı görüldü.

4.1.2. *A. vera* Yaprak Pulpası Ekstresinin Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi

Lipit peroksidasyonunun inhibisyonu şeklinde yansıyan antioksidan aktivitesinin incelenmesinde, ekstrenin en düşük antioksidan aktiviteyi 5 mg/ml’de, en yüksek antioksidan aktiviteyi ise 60 mg/ml’de gösterdiği ve bu konsantrasyonda platoya ulaştığı görüldü (Şekil 4-1). Ekstrenin 60 mg/ml’de gösterdiği antioksidan aktivitenin (% $71,91 \pm 0,65$), α -tokoferolün 0,5 mg/ml’de (% $82,90 \pm 0,56$) gösterdiği antioksidan aktivitesinden daha düşük ($p < 0,05$) olduğu görüldü.

Ekstrenin ve standartların antioksidan aktivitelerini kıyaslayabilmek için efektif konsantrasyonları (EC_{50}) hesaplandı (Tablo 4-5). Düşük EC_{50} değeri yüksek antioksidan aktivitesinin göstergesidir.

A. vera yaprak pulpası ekstresinin ($41,74 \pm 0,18$ mg/ml) ve α -tokoferol'ün ($0,30 \pm 0,01$ mg/ml) EC_{50} değerleri kıyaslandığında *A. vera* ekstresinin antioksidan aktivitesinin α -tokoferolün aktivitesinden düşük ($p < 0,05$) olduğu saptandı.

Lipit peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle MDA ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Antioksidan içermeyen kontrol deneyinde $6,99 \pm 0,18$ nM/g lesitin MDA oluşurken, 60 mg/ml ekstreyi içeren deneyde $1,98 \pm 0,03$ nM/g lesitin MDA, 0,5 mg/ml α -tokoferolü içeren deneyde ise $0,91 \pm 0,07$ nM/g lesitin MDA oluştuğu gözlemlendi, *A. vera* yaprak pulpası ekstresinin ve α -tokoferolün MDA oluşumunu ve dolayısıyla lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı.

A. vera ekstresinin antioksidan aktivitesi ile fenol ($r^2 = 0,9998$) ve flavonoid ($r^2 = 0,9956$) miktarı arasında yüksek korelasyon gözlemlendi.

4.1.3. Troloks Ekvivalan Antioksidan Kapasitesinin (TEAC Deneyi) İncelenmesi

Bu çalışmada *A. vera* sulu ekstresinin ABTS^{•+} giderici aktivitesine sahip olduğu belirlendi. 60 mg/ml konsantrasyonda *A. vera* yaprak pulpasının sulu ekstresi (% $78,22 \pm 0,85$), 0,5 mg/ml askorbik asidin (% $98,03 \pm 0,64$) ve 1 mg/ml α -tokoferolün (% $99,41 \pm 0,45$) aktivitesine göre daha düşük ($p < 0,05$) ABTS^{•+} giderici aktivitesi gösterdiği saptandı (Şekil 4-2).

Ekstrenin EC_{50} değeri ($34,77 \pm 0,41$ mg/ml) askorbik asidin ($0,276 \pm 0,0028$ mg/ml) ve α -tokoferolün ($0,533 \pm 0,0021$ mg/ml) EC_{50} değerlerinden yüksek olduğu için antioksidan aktivitesinin standartlara kıyasla düşük ($p < 0,05$) olduğu sonucuna varıldı.

Ekstrenin total antioksidan kapasitesi TEAC değeri (Troloks Ekvivalan Antioksidan Kapasite) olarak değerlendirildi. 1 TEAC 1 mM/L troloksa ekvivalan test edilen ekstre veya standartın konsantrasyonu olarak ifade edildi. TEAC değeri antioksidan aktivitesinin kantitatif tayini olduğu için yüksek TEAC değeri yüksek antioksidan aktivitesinin göstergesidir. Askorbik asit 0,5 mg/ml'de ($2,09 \pm 0,011$ mM/L

veya) ve α -tokoferol 1 mg/ml'de ($2,12 \pm 0,010$ mM/L) yüksek TEAC değeri gösterirken *A. vera* sulu ekstresinde 60 mg/ml'de ($1,66 \pm 0,017$ mM/L veya $1,21 \pm 0,020$ mM/g yaprak pulpası) daha düşük ($p < 0,05$) TEAC değeri saptandı.

A. vera ekstresinin TEAC değeri ile fenol ($r^2 = 0,9904$) ve flavonoit ($r^2 = 0,9691$) miktarı arasında yüksek korelasyon gözlemlendi.

4.1.4. DPPH Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi

A. vera yaprak pulpası sulu ekstresinin yüksek konsantrasyonlarda hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterdiği görüldü. 60 mg/ml konsantrasyonda *A. vera* yaprak pulpasının sulu ekstresinin (% $70,81 \pm 0,27$), askorbik asidin 0,25 mg/ml'de (% $96,01 \pm 0,37$) ve α -tokoferolün 0,5 mg/ml'de (% $88,31 \pm 1,81$) gösterdikleri DPPH• giderici aktivitesine göre daha zayıf ($p < 0,05$) DPPH radikali giderici aktivitesi gösterdiği saptandı (Şekil 4-3).

Ekstrenin ve standartların EC_{50} değerleri kıyaslandığında askorbik asidin en yüksek DPPH radikal giderici aktivitesi ($69,22 \pm 2,65$ μ g/ml) gösterdiği, bunu α -tokoferolün ($341,02 \pm 1,05$ μ g/ml) takip ettiği ve en düşük ($p < 0,05$) aktiviteyi ise *A. vera* ekstresinin ($41,81 \pm 0,55$ mg/ml) gösterdiği görüldü.

A. vera ekstresinin DPPH radikal giderici aktivitesi ile fenol ($r^2 = 0,9999$) ve flavonoit ($r^2 = 0,9927$) miktarı arasında yüksek korelasyon gözlemlendi.

4.1.5. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi

Ekstrenin süperoksit radikali giderici aktivitesi 10 mg/ml konsantrasyonunda (% $62,92 \pm 1,23$), askorbik asidin 0,5 mg/ml konsantrasyonunda (% $62,06 \pm 1,44$) gösterdiği aktivitesine yakın ($p > 0,05$) bulundu (Şekil 4-4).

EC_{50} değerleri kıyaslandığında ise *A. vera* ekstresinin ($5,76 \pm 0,19$ mg/ml), askorbik asite ($0,389 \pm 0,010$ mg/ml) göre daha zayıf ($p < 0,05$) süperoksit radikali giderici aktivitesi gösterdiği görüldü. α -Tokoferol ise süperoksit radikal giderici aktivitesi göstermedi.

4.1.6. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyelinin (FRAP Deneyi) İncelenmesi

A. vera sulu ekstresinin indirgeyici gücü FRAP değeri olarak ifade edildi. Yüksek FRAP değeri yüksek indirgeyici gücün göstergesidir. 60 mg/ml

konsantrasyonunda *A. vera* sulu ekstresi ($1,02 \pm 0,003$ mM/L Fe^{2+} veya $1,14 \pm 0,041$ mM/g yaprak pulpası Fe^{2+}), askorbik asidin 0,5 mg/ml konsantrasyonunda ($1,84 \pm 0,011$ mM/L Fe^{2+}) ve α -tokoferolün 1 mg/ml konsantrasyonundaki ($1,81 \pm 0,012$ mM/L Fe^{2+}) indirgeyici gücünden daha zayıf ($p < 0,05$) indirgeyici güç gösterdiği belirlendi.

A. vera ekstresinin indirgeyici gücü ile fenol ($r^2 = 0,9918$) ve flavonoit ($r^2 = 0,9717$) miktarı arasında yüksek korelasyon gözlemlendi.

A. vera ekstresinin redükleyici gücü ile antioksidan aktivitesi ($r^2 = 0,9955$), DPPH• ($r^2 = 0,9857$) ve ABTS•+ ($r^2 = 0,9916$) giderici aktiviteleri arasında yüksek korelasyon bulunarak ekstrenin antioksidan aktivitesinin, serbest radikal giderici aktivitesi ile indirgeyici gücünden ileri gelebileceği düşünüldü.

A. vera yaprak pulpasından affinite kromatografisi ile saflaştırılan lektinin DPPH• giderici aktivitesi olmadığı saptandı.

Tablo 4-1: *A. vera* yaprak pulpasından hazırlanan sulu ekstrenin içerdiği total ekstre edilebilen madde miktarı (EC), askorbik asit, β -karoten, α -tokoferol, fenolik maddelerin (PC, yaprak ağırlığının her gramı için gallik asit ekivalanı olarak) ve flavonoit (yaprak ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı olarak) miktarları.

Ekstre	EC	Askorbik asit	β-Karoten	α-Tokoferol	PC	Flavonoit
	g/g yaprak pulpası	mg/g yaprak pulpası	μg/g yaprak pulpası	μg/g yaprak pulpası	mg GAE/g yaprak pulpası	mg KE/g yaprak pulpası
<i>A. vera</i> ekstresi	0,0264	0,422 $\pm$ 0,029	15,51 $\pm$ 2,39	1,47 $\pm$ 0,11	0,241 $\pm$ 0,014	0,245 $\pm$ 0,005

Tablo 4-2: *A. vera* yaprak pulpasından hazırlanan sulu ekstrenin konsantrasyona bağlı olarak gösterdiği lipit peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri; ABTS^{•+}, DPPH[•] ve süperoksit radikali giderici aktivitesi yüzdeleri; MDA, TEAC ve FRAP değerleri.

Ekstre	mg/ml	LP inhibisyonu (%)	ABTS ^{•+} giderici aktivitesi (%)	DPPH [•] giderici aktivitesi (%)	Süperoksit radikali giderici aktivitesi (%)	MDA nM/g lesitin	TEAC (mM/L)	FRAP (mM/L)
<i>A. vera</i> ekstresi	80	72,73 ± 1,16	78,65 ± 0,34	71,84 ± 1,13	62,92 ± 1,23	1,85 ± 0,02	1,67 ± 0,010	1,26 ± 0,014
	60	71,91 ± 0,65	78,22 ± 0,85	70,81 ± 0,27	62,92 ± 1,23	1,98 ± 0,03	1,66 ± 0,017	1,02 ± 0,003
	40	56,01 ± 1,90	67,34 ± 1,45	62,64 ± 1,14	62,92 ± 1,23	3,23 ± 0,36	1,42 ± 0,028	0,79 ± 0,017
	20	34,51 ± 3,21	45,27 ± 1,48	36,08 ± 2,08	62,92 ± 1,23	4,71 ± 0,14	0,94 ± 0,034	0,55 ± 0,017
	10	24,50 ± 3,77	23,59 ± 0,81	19,60 ± 1,88	62,92 ± 1,23	5,12 ± 0,08	0,47 ± 0,017	0,44 ± 0,006
	5	12,08 ± 1,38	12,67 ± 0,96	6,47 ± 0,84	62,72 ± 2,06	5,66 ± 0,56	0,22 ± 0,020	0,32 ± 0,003
	2,5				38,55 ± 0,62			
	1,25				20,24 ± 1,34			
	0,625				10,20 ± 1,33			

Tablo 4-3: α -Tokoferolün konsantrasyona bağılı olarak gösterdiği lipit peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri; ABTS^{•+} ve DPPH[•] radikali giderici aktivitesi yüzdeleri; MDA, TEAC ve FRAP değerleri.

Standart	mg/ml	LP inhibisyonu (%)	ABTS ^{•+} giderici aktivitesi (%)	DPPH [•] giderici aktivitesi (%)	MDA nM/g lesitin	TEAC (mM/L)	FRAP (mM/L)
α-tokoferol	1,0	83,33 $\pm$ 0,84	99,41 $\pm$ 0,45	88,89 $\pm$ 1,19	0,90 $\pm$ 0,15	2,12 $\pm$ 0,010	1,81 $\pm$ 0,012
	0,5	82,90 $\pm$ 0,56	51,36 $\pm$ 2,12	88,31 $\pm$ 1,81	0,91 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,073	1,34 $\pm$ 0,130
	0,25	61,91 $\pm$ 1,70	35,22 $\pm$ 1,19	62,57 $\pm$ 3,80	2,74 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,028	0,88 $\pm$ 0,013
	0,125	45,07 $\pm$ 1,60	17,29 $\pm$ 0,43	32,47 $\pm$ 2,97	3,20 $\pm$ 0,25	0,33 $\pm$ 0,010	0,66 $\pm$ 0,098
	0,0625	27,29 $\pm$ 1,83		14,15 $\pm$ 1,80	5,15 $\pm$ 0,01		0,56 $\pm$ 0,056
	0,031	9,44 $\pm$ 0,76		8,71 $\pm$ 1,06	6,43 $\pm$ 0,03		

Tablo 4-4: Askorbik asidin konsantrasyona bağılı olarak gösterdiği ABTS^{•+}, DPPH[•] ve süperoksit radikali giderici aktivitesi yüzdeleri; TEAC ve FRAP değerleri.

Standart	mg/ml	ABTS ^{•+} giderici aktivitesi (%)	DPPH [•] giderici aktivitesi (%)	Süperoksit radikali giderici aktivitesi (%)	TEAC (mM/L)	FRAP (mM/L)
Askorbik asit	0,5	98,03 ± 0,64	96,47 ± 0,36	62,06 ± 1,44	2,09 ± 0,011	1,84 ± 0,011
	0,25	56,22 ± 1,08	96,01 ± 0,37	38,19 ± 1,26	1,18 ± 0,023	1,02 ± 0,038
	0,125	29,70 ± 0,69	88,73 ± 1,09	22,41 ± 1,27	0,60 ± 0,015	0,60 ± 0,014
	0,0625	14,86 ± 0,78	70,45 ± 2,76	6,63 ± 1,23	0,27 ± 0,015	0,40 ± 0,011
	0,031		44,17 ± 0,92			0,20 ± 0,007
	0,016		19,93 ± 0,74			
	0,008		10,69 ± 1,74			

Tablo 4-5: *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin EC₅₀, TEAC ve FRAP değeri olarak antioksidan aktivitesi.

Ekstre	Antioksidan aktivitesi^a (lipozom sistemi) EC₅₀ (mg/ml)	ABTS^b EC₅₀ (mg/ml)	DPPH^c EC₅₀ (mg/ml)	SOD^d EC₅₀ (mg/ml)	Total Antioksidan potansiyeli^e (mM TEAC/g yaprak pulpası)	FRAP değeri^f (mM Fe²⁺/g yaprak pulpası)
<i>A. vera</i> ekstresi	41,74 ± 0,18	34,77 ± 0,41	41,81 ± 0,55	5,76 ± 0,19	1,21 ± 0,020	1,14 ± 0,041

^a EC₅₀ değeri (% 50 TBARS oluşumunun inhibisyonunu sağlayan ekstre konsantrasyonu).

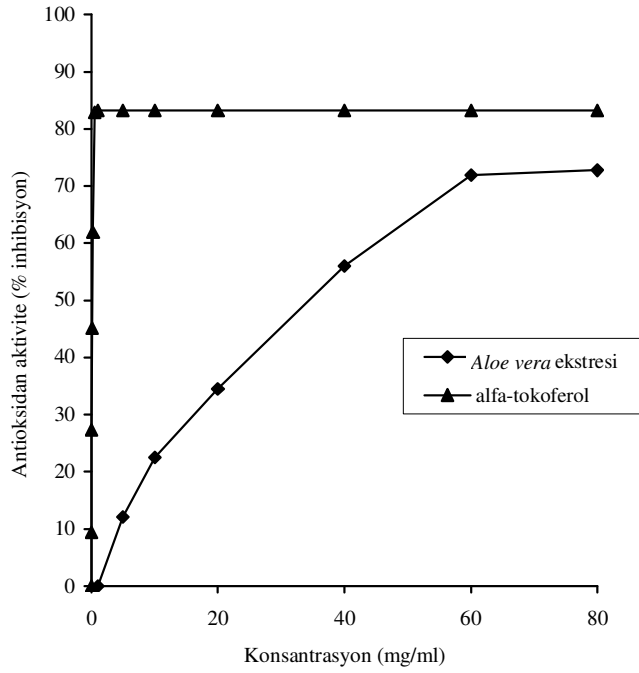
^b EC₅₀ değeri (% 50 ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı).

^c EC₅₀ değeri (% 50 DPPH radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı).

^d EC₅₀ değeri (% 50 süperoksit radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı).

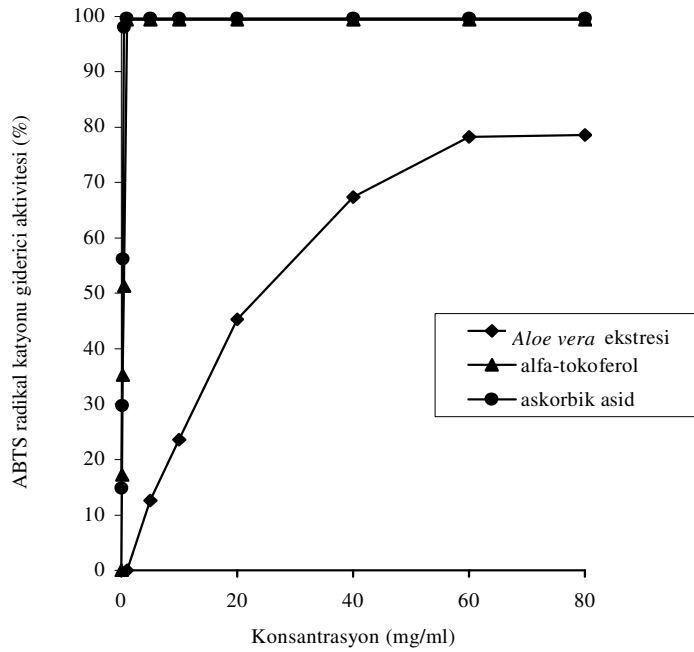
^e mM Troloks ekivalanı olarak ifade edildi.

^f mM Fe (II) iyonları ekivalanı olarak ifade edildi.



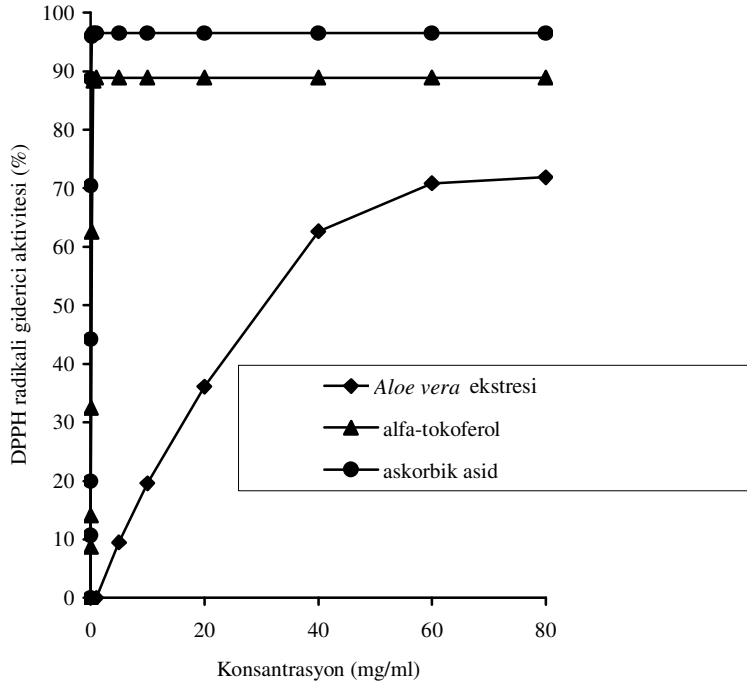
Şekil 4-1: *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin TBA metoduna göre antioksidan aktivitesi.

Deneyler üç kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ($n = 3$).



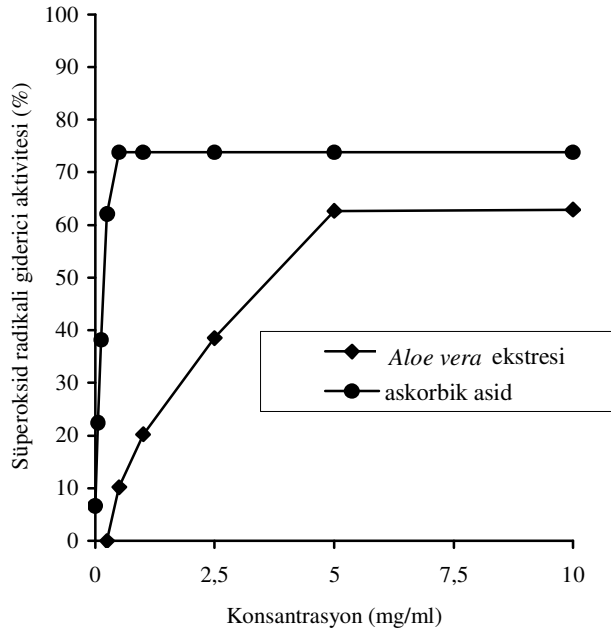
Şekil 4-2: *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi.

Deneyler üç kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ($n = 3$).



Şekil 4-3: *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin DPPH radikali giderici aktivitesi.

Deneyler üç kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ($n = 3$).



Şekil 4-4: *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin süperoksit radikali giderici aktivitesi.

Deneyler üç kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ($n = 3$).

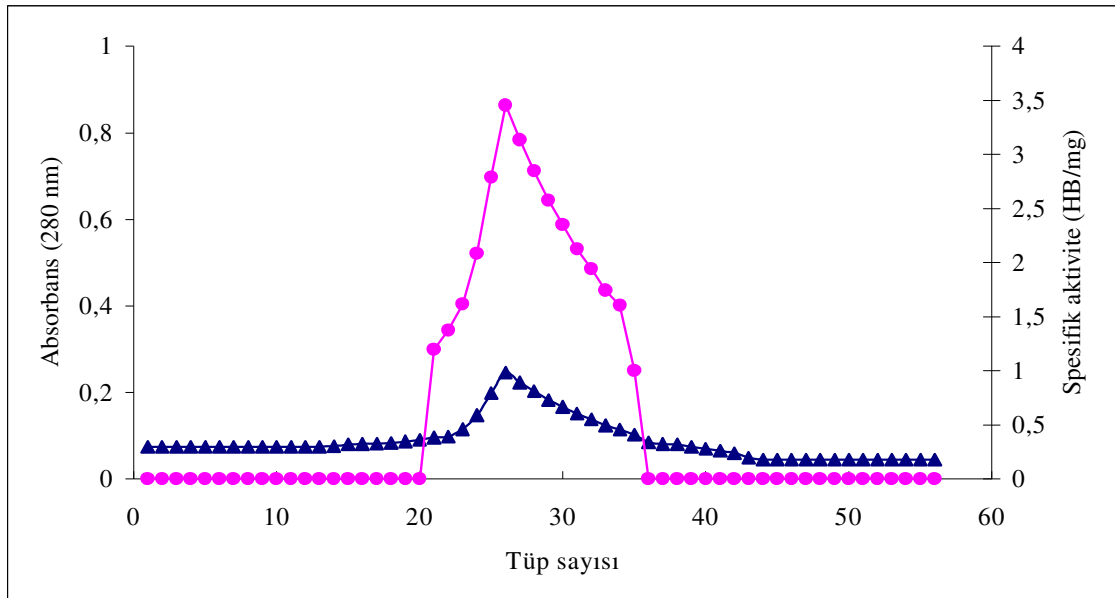
4.2. A. vera Yaprak Pulpasındaki Lektinin Saflaştırılma Evrelerindeki Protein Miktarları ve Hemaglutinasyon Aktivitelerinin İncelenmesi

A. vera yaprak pulpasındaki lektinin saflaştırma evrelerindeki protein miktarları ve hemaglutinasyon aktiviteleri Tablo 4-6'da, ham ekstre % 50 amonyum sülfat kesitinin affinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği ise Şekil 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4-6: *A. vera* yaprak pulpasından lektin saflaştırılması evreleri.

Saflaştırma evresi	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	HA titresi	HB/mg	Saflaştırma oranı
Ham ekstre	450	4,22	1899	8	7,58	1
% 50 Amonyum sülfat kesiti	176	0,84	147,8	64	152,4	20,1
Affinite kromatografisi	3	0,28	0,84	64	457,1	60,3

499,96 g *A. vera* yaprak pulpasıyla çalışıldı.



Şekil 4-5: *A. vera* yaprak pulpası ham ekstresi % 50 amonyum sülfat kesitinin affinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği.

Sütun boyutları: 16 x 1,5 cm., Akış hızı: 75 ml/saat. ●—●: Spesifik aktivite (HB/mg), ▲—▲: Protein (mg/ml).

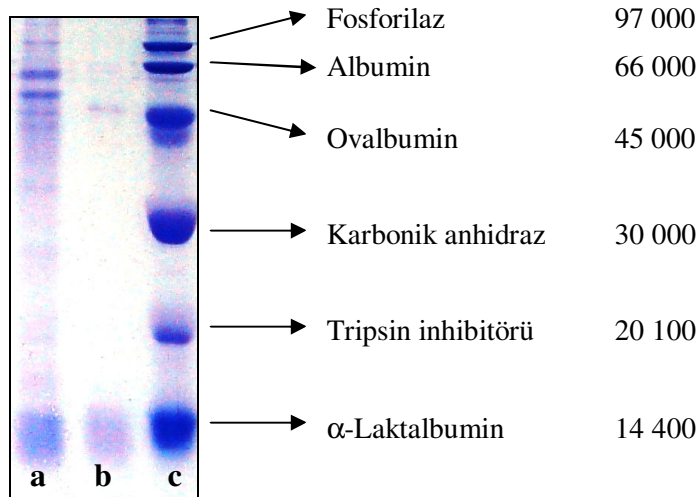
4.3. Poliakrilamit Jel Elektroforezi

A. vera yaprak pulpasındaki lektinin affinite kromatografisi ile elde edilen elüatının doğal poliakrilamit jel elektroforezindeki tek protein bandı Şekil 4-6'da görülmektedir.



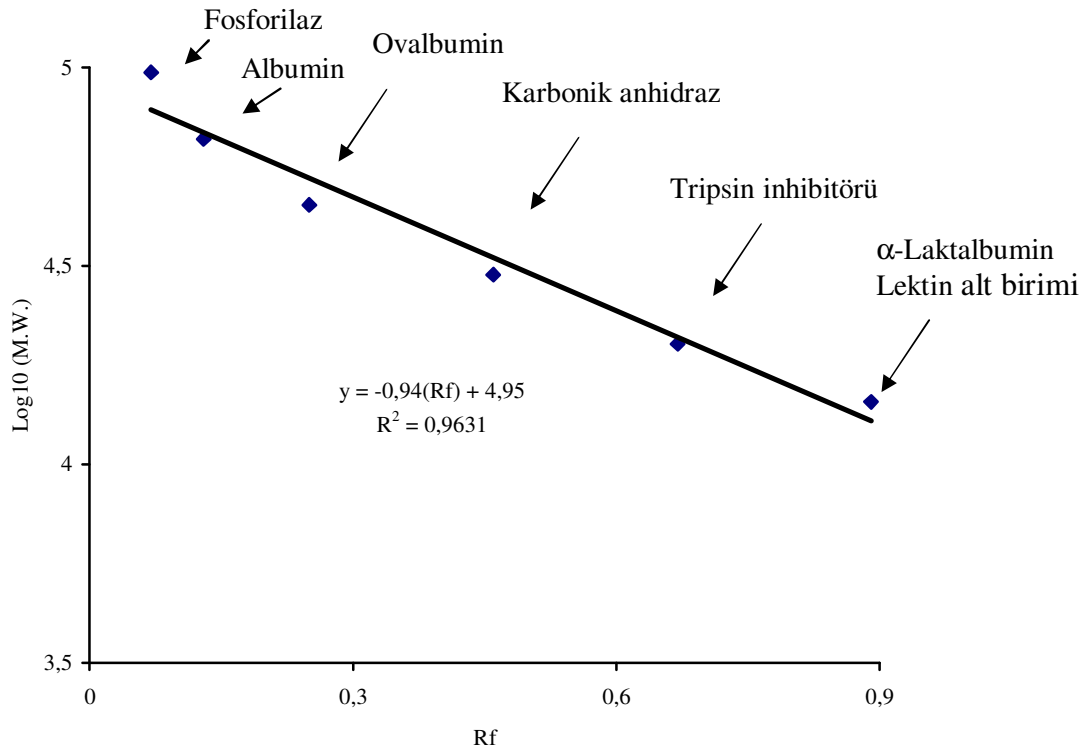
Şekil 4-6: *A. vera* yaprak pulpasındaki lektinin affinite kromatografisiyle elde edilen elüatın doğal poliakrilamit jel elektroforezindeki tek protein bandı.

A. vera yaprak pulpasındaki lektinin affinite kromatografisi ile elde edilen elüatın SDS-PAGE'deki jel elektroforezinde biri çok hafif diğeri kalın iki protein bandı Şekil 4-7'de görülmektedir. Bu bantlardan birinin molekül ağırlığı 45 000, diğerrinin ise 14 400 olarak bulundu (Şekil 4-8).



Şekil 4-7: *A. vera* yaprak pulpası ham ekstresi ile bu ekstreden affinite kromatografisi ile elde edilen lektin elüatının, düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak çalışılan SDS-PAGE'deki protein bantları.

a) Ham ekstre, b) Lektin, c) Düşük molekül ağırlıklı standart proteinler (LMW).



Şekil 4-8: Düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerin SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemleri.

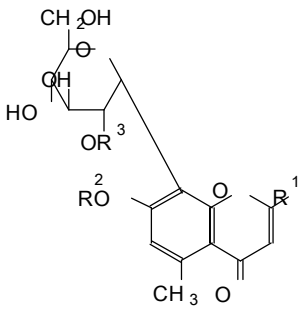
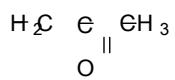
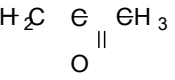
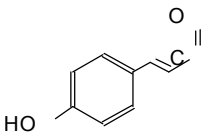
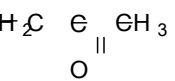
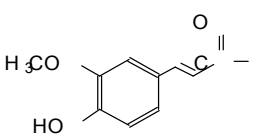
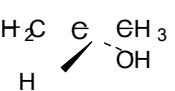
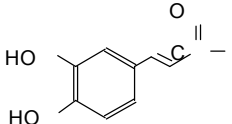
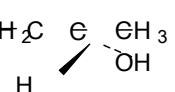
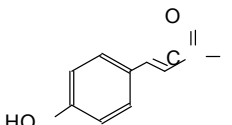
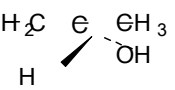
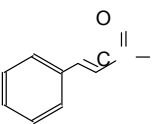
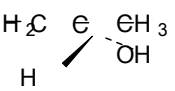
5. TARTIŞMA

5.1. *A. vera* Yaprak Pulpasının Antioksidan Aktivitesi

Bitkilerin çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik etkilerinin antioksidanlarla ilgili olduğu son yıllarda tartışılmaya başlanmıştır. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bu bileşikler içerisinde en fazla bulunanları flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Scalbert ve ark. 2005). Fenol ve flavonoidler yaygın olarak tanınan ve biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonunu inhibe eden doğal antioksidan yapılardır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisinin, serbest radikalleri giderme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma (Rice-Evans ve ark. 1997) gibi özelliklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Antioksidanlar hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterirler ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürürler. Bu şekilde oluşan antioksidan radikali, oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki çiftleşmemiş elektronun yer değiştirmesiyle stabilize olur. Bu nedenle antioksidan moleküller yapılarında genellikle fenolik fonksiyon taşırlar.

A. vera'nın antioksidan aktivitesiyle ilgili az sayıda çalışma son on yılda yapılmıştır. *A. barbadensis*'in metanolik ekstresinden antioksidan özelliğinde 8-C- β -D-[2-O-(E)-kumaril]glukopironozil-2-[2-hidroksil]-propil-7-metoksi-5-metilkromon izole edildiği bildirilmiştir (Lee ve ark. 2000).

Yagi ve arkadaşları (2002) *A. vera*'dan izole edilmiş antioksidan aktivitesi gösteren aloesin, aleresin (p-kumarolaloesin), feruloaloesin, izorabaikromon, izoaloesin D, izoaloesin E ve 7-metoksi-8-glukosilaloesol gibi fenolik bileşiklerini şekil halinde vermiştir (Şekil 5-1).

			
	R ¹	R ²	R ³
1		H	H
2		H	
3		H	
4		CH ₃	
5		CH ₃	
6		CH ₃	
7		CH ₃	H
			7-Metoksi-8-glukozilaloelsol

Şekil 5-1: *A. vera*'dan izole edilen bazı bileşiklerin kimyasal konfigürasyonları-Yagi ve arkadaşları (2002)'den.

A. vera'dan izole edilen aloesin türevlerinden izorabaikromon, feruloilaloesin ve p-kumaroilaloesinin güçlü DPPH ve süperoksit radikali giderici aktivitesi gösterdikleri bildirilmiştir ve izorabaikromon bileşiğinin süperoksit radikali giderici aktivitesinin kafeoil grubundan ileri gelebileceği düşünülmüştür (Yagi ve ark. 2002). Kafeoil grubu hidrojen atomunu kolayca vererek ortamdaki serbest radikalleri giderir ve lipit peroksidasyonunu devam ettiren zincir reaksiyonunu durdurur. Aynı çalışmada askorbat ile indüklenmiş lipit peroksidasyon sisteminde feruloilaloesinin (IC_{50} 85 μM) ve barbaloinin (IC_{50} 64 μM), NADPH oksidasyonu ile indüklenmiş lipit peroksidasyonu sisteminde ise isorabaikromonun (IC_{50} 23 μM) lipit peroksit oluşumunu inhibe edici aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Aloesin ve benzeri türevlerinin ise her iki sistemde düşük aktivite gösterdikleri bildirilmiştir.

Beppu ve arkadaşları (2003) *A. arborescens*'in kaynatılmış yaprak derisinde (skin) fenolik bileşiklerin en büyük kısmını kromon türevleri olan 2'-*O*-p-kumaroilaloesin (EC_{50} 69,3 μM) ile 2'-*O*-feruloilaloesinin (EC_{50} 38,7 μM) oluşturduğunu ve bu bileşiklerin DPPH radikali giderici aktivitelerinin antron türevleri olan izobarbaloin (EC_{50} 373,7 μM) ve barbaloin (EC_{50} 377,7 μM) aktivitelerinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Antioksidan enzimlerden süperoksit dismutazın Mn-SOD izomerinin *A. vera* yaprak derisi ve yaprak pulpasındaki varlığı tespit edilmiş ve molekül ağırlığı tayin edilmiştir (32-42 kDa) (Sabeh ve ark. 1996). Süperoksit dismutazın Cu- ve Zn-SOD izoenzimlerin aktiviteleri ise Kidachi aloe (*A. arborescens* Miller var. natalensis Berger) yaprak derisi ve pulpasında tespit edilmiştir. *Aloe* yaprak pulpasının SOD aktivitesi düşük molekül ağırlıklı vitamin C, E ve karotenoitlerin varlığını düşündürmektedir. Bu çalışmada *A. vera* yaprak pulpasında bu vitaminlerin varlığı kanıtlanmıştır. *A. vera* yaprak pulpasının antioksidan aktivitesinin, içerdiği fenol bileşikleri, flavonoidler, karotenoitler, α -tokoferol ve askorbik asitten ileri gelebileceği düşünülmüştür (Kato ve Arai 1997; Eshun ve He 2004)

Aloe bitkisinde düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin en büyük kısmını antrakınon ve antronların oluşturduğu bildirilmiştir (Malterud ve ark. 1993)

A. vera'dan süperoksit ve hidroksil radikali giderici aktivitesi gösteren iki kumarin izole edilmiştir (Zhang ve ark. 2006).

A. vera ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin, bitkinin çeşitli gelişme zamanlarına göre değiştiği gösterilmiştir (Hu ve ark. 2003). Aynı çalışmada *A. vera* ekstresinin DPPH radikali giderici aktivitesinin BHT ve α -tokoferolle eşit veya daha yüksek olduğu bildirilmiştir. *A. vera* yaprak derisinin etanol ekstresinin DPPH radikali giderici aktivitesi % 39,7 olarak bildirilmiştir (Hu ve ark. 2005). Bizim çalışmamızda *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin daha güçlü bir DPPH radikali giderici aktivitesi (% 70,81) gösterdiği görülmektedir.

A. vera yaprak derisinin etanol ekstresinin TEAC değeri 2,60 mM/mg olarak bildirilmiştir (Hu ve ark. 2005). Rice-Evans ve arkadaşlarına (1997) göre yüksek radikal giderici etkisine sahip olan flavonoidlerin TEAC değerleri 1,9 mM'den yüksektir, 1,5 mM TEAC değerini gösteren flavonoidlerin radikal giderici etkisi düşüktür. Bu sınıflandırma göz önüne alınırsa *A. vera* yaprak pulpasından elde edilen sulu ekstrenin TEAC değeri (1,21mM /g) antioksidan aktivitesi düşüktür.

Birçok araştırmada antioksidan aktivite ile indirgeyici güç arasında yüksek korelasyon bulunmuş ve indirgeyici gücün, antioksidan aktivitesinin bir göstergesi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar da bunu doğrular niteliktedir. *Aloe* ekstresinin FRAP değeri (1,14 mM/g) fenolik bileşikler içeren birçok ekstre ile uyum göstermektedir (Li ve ark. 2006; Kanatt ve ark. 2007).

5.2. *A. vera* Yaprak Pulpası Lektini

Lektinlerin antioksidan aktiviteleri hakkında literatürde kaynağa rastlanmamıştır. Bazı polisakkaritlerin antioksidan etkileri bildirilmiştir. Bunlardan, *A. barbadensis*'in jel ve yaprak derisinden anyon değiştirici ve tekrarlanan jel kromatografileri kullanılarak izole edilen ve GAPS-1 ile SAPS-1 olarak adlandırılan polisakkaritlerin, güçlü süperoksit ve orta derecede hidroksil radikali giderici aktivitesi, ferri iyonu kelatlama aktivitesi, indirgeyici gücü ve lipid peroksidasyonu inhibe edici aktivitesi gösterdikleri bildirilmiştir (Chun-hui ve ark. 2007).

Başka bir çalışmada *A. vera* var. *chinensis* (Haw.)'in yapraklarından anyon-değiştirici ve tekrarlanan jel kromatografileri kullanılarak mannoz ve glukozdan oluşan polisakkaritin (APS-1) süperoksit ve hidroksil radikali giderici gücü, bakır ile indüklenmiş LDL oksidasyon sisteminde inhibitör etkisi ve farelerdeki PC12 hücrelerinde (feokromositoma hücreleri) hidrojen peroksit ile indüklenmiş lezyonlara karşı koruyucu etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Wu ve ark. 2006).

Kardošová ve Machová (2006) *A. vera* yapraklarından izole ettikleri polisakkaritlerin soya lesitininden hazırlanan lipozomlarda Fenton reaksiyonu sonucu oluşan OH radikalleri ile başlatılan lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda *Aloe* yaprak pulpasından saflaştırılan ve glikoprotein yapısında olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan lektinin ve polisakkaritçe zengin olduğu bilinen jelin *Aloe*'nin sulu ekstresinin gösterdiği antioksidan aktiviteyi göstermemesi bu çalışmalarla uygunluk göstermemektedir.

Bitkilerin gösterdikleri antitümör etkilerin içerdikleri antioksidan bileşiklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Daha önce laboratuvarımızda *A. vera* yaprak pulpasından saflaştırılan ve Aloctin I olarak adlandırılan lektinin, tümör koruyucu etkisinin *Aloe* yaprak pulpasının antitümör etkisinden daha az olması (Akev ve ark. 2007b), bu tezde lektinin antioksidan aktivite göstermemesi ile açıklanabilir.

Lektinler, genellikle glikoprotein yapısında proteinler oldukları gibi, aynı zamanda hücre zarında karbohidratlara veya glikoproteine spesifik olarak bağlanırlar. Bu özelliklerinden affinite kromatografisi ile saflaştırılmalarında yararlanılır. Laboratuvarımızda daha önce *A. vera* yaprak pulpasından (Akev ve ark. 2002-2003) ve jelinden (Malkoç ve Akev 1999) elde edilen lektinlerin de glikoprotein yapısında oldukları saptanmıştır .

Lektinlerin molekül ağırlıklarının 26 000 - 400 000 dalton arasında değiştiği bildirilmiştir (Akev 1989). Aynı kaynakta bulunan, alt birimleri ve biyolojik etkileri aynı veya benzer olan lektinlere izolektin adı verilmiştir. Farklı genler tarafından kodlandığı ileri sürülen izolektinlerinin içerdikleri alt birimlerin, özdeş veya değişik olabileceği de bildirilmiştir (Sharon ve Lis 1972; Lis ve Sharon 1981b).

Lektin elde edilmesinde çeşitli saflaştırma yöntemlerinden yararlanılmıştır. Lektinler amonyum sülfatla çöktürme, kolon kromatografisi (iyon değiştirici ve hidroksilapatit), jel filtrasyon gibi ayırma yöntemlerinin kullanılmasıyla çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir (Sharon ve Lis 1972). Affinite kromatografisinin lektinlerin saflaştırılmasında kullanılması 1980'li yıllarda başlanmıştır (Lis ve Sharon 1981b). Son yıllarda affinite kromatografisinin uygulanması lektinlerin tek basamaklı saflaştırılmalarına olanak sağlamıştır. Adsorban olarak CNBr ile aktive edilmiş Sefaroz 4B, ligand olarak fetuin, tiroglobulin, BSA gibi serum glikoproteinleri veya

karbohidratların kullanılmasıyla liganda bağlanan lektinler, daha sonra, pH değişikliği / tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilerek çeşitli bitkisel kaynaklardan saflaştırılmışlardır (Sela ve ark. 1975; Nowak ve ark. 1977). Ancak değişik kaynaklardan saflaştırılan her bir lektin için uygun ligandın bulunması gerekmektedir. Çalışmamızda yapılan aglutinasyon deneyleri sonucunda N-asetil-D-galaktozamin ve ovalbumin uygun ligant olarak saptanmıştır ve aralarından ovalbumin seçilmiştir. Sonuç olarak *A. vera* lektininin saflaştırmasında affinite kromatografisi yöntemi ilk kez uygulanmış ve lektin bu yöntemle 60 kez saflaştırılmıştır (Tablo 4-6).

Son yıllarda *Aloe* cinslerinde lektinlerin varlığından söz edilmektedir. İlk kez 1979 yılında *A. arborescens* yapraklarından iki lektin saflaştırılmıştır. Bu lektinlerin molekül ağırlıklarının 18 000 ve 24 000 dalton olduğu ve her birinin iki alt biriminden oluştuğu saptanmıştır (Suzuki ve ark. 1979). Laboratuvarımızda *A. vera* yaprak pulpasından tuzla fraksiyonlu çöktürme ve hidroksilapatit sütun kromatografisi yöntemleriyle Aloctin I ve Aloctin II olarak adlandırılan iki izolektin izole edilmiştir (Akev ve Can 1999). Yaprakların jel kısmından elde edilen lektinle, yaprak pulpasından saflaştırılan Aloctin II'nin, her ikisinin de hidroksilapatit sütundan 0,05 M tamponla elüe olmaları dolayısıyla özdeş oldukları ileri sürülmüştür (Malkoç ve Akev 1999). Aloctin I'in Sephadex G-50 jel filtrasyonu ile daha ileri saflaştırılması sonucunda doğal poliakrilamit jel elektroforezinde Aloctin I ve Aloctin II'nin molekül ağırlıklarının 45 000 dalton olduğu belirlenmiş ve SDS – PAGE'de her birinin molekül ağırlığı 15 000 dalton olan üç altbiriminden oluştuğu sonucuna varılmıştır (Akev ve ark. 2002-2003). SDS-PAGE'de görülen 45 000 daltonluk molekül ağırlığındaki hafif bant, küçük bir kirliliği veya tam ayrılmamış ovalbumini gösterebilir (Şekil 4-7). Asıl bantın 14 400 dalton molekül ağırlığındaki proteini göstermesi (Şekil 4-8), saflaştırılan lektinin daha önce Akev ve Can tarafından saflaştırılan Aloctin I'le aynı olduğunu kanıtlamaktadır. Tarafımızdan saflaştırılan lektinin molekül ağırlığı daha önceki çalışmalarda *A. arborescens*'ten saflaştırılan lektinlerinkiyle tam aynı olmasa da yakın bulunmuştur (Suzuki ve ark. 1979; Koike ve ark. 1995).

Tezimizde daha önce aynı laboratuvarda saflaştırılan Aloctin I, çok daha spesifik bir saflaştırma yöntemi olan affinite kromatografisi ve doğal PAGE'inde tek bant gösteren saflıkta elde edilmiştir.

5.3. Sonuç

Bu çalışmada tarafımızdan kültürü yapılan *A. vera* (L.) Burm. fil. bitkisinin yaprak pulpası ve jelinin sulu ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri 5 adet antioksidan deneyi kullanılarak incelenmiştir. *A. vera* yaprak pulpası ekstresinin referans maddelere göre daha düşük antioksidan aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. *A. vera* yaprak jeli ile yapılan DPPH radikali giderici aktivitesi deneyinde jelin antioksidan özellik göstermediği saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda, *A. vera* yaprak pulpası sulu ekstresinden tuzla çöktürme ve affinite kromatografisi yöntemleriyle elde edilen lektinin saflaştırılmasında yeni bir affinite kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve lektin bu yöntemle poliakrilamit jel elektroforezinde tek bant gösterecek saflıkta, 60 kez saflaştırılmıştır. *A. vera* lektininin DPPH radikali giderici aktivitesi göstermediği saptanmış ve *A. vera*'nın antioksidan özelliğinin fenolik bileşiklerden ve antioksidan vitaminlerden ileri geldiği öne sürülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abou-Seif, M.A. ve Youssef, A. (2004). Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, **346**, 161–170.
- Akev, N. (1989). Lektinler. *Biyokimya dergisi*, **14**, 51–61.
- Akev, N. ve Can, A. (1999). Separation and some properties of *Aloe vera* L. leaf pulp lectins. *Phytotherapy Research*, **13**, 489–493.
- Akev, N., Malkoç, S. ve Can, A. (2002-2003). Further characterization of *Aloe vera* leaf pulp lectins. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, **35–36**, 1–11.
- Akev, N. (2004). Aloe, mucize ve bilim, Seminer, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Akev, N., Turkay, G., Can A., Gurel, A., Yildiz, F., Yardibi, H. ve ark. (2007a). Effect of *Aloe vera* leaf pulp extract on *Ehrlich ascites* tumours in mice. *European Journal of Cancer Prevention*, **16**, 151–157.
- Akev, N., Turkay, G., Can, A., Gurel, A., Yildiz, F., Yardibi, H. ve ark. (2007b). Tumor preventive effect of *Aloe vera* leaf pulp lectin (Aloctin I) on *Ehrlich ascites* tumours in mice. *Phytotherapy Research*, **21**, 1070–1075.
- Altan, N., Dinçel, A.S. ve Koca, C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, **31**, 51–56.
- Anadolu, R.Y., Erdem, C., Erdi, H., Taşpınar, A. (1992). Skuamöz hücreli karsinoma tanısında peanut agglutinin. *Dermatoloji Dergisi*, **1**, 46–50.
- Anderson, D. ve Phillips, B.J. (1999). Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 1015–1025.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, **6**, 593–597.
- Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **75**, 199–212.
- Ateş, A. ve Akın, M. (1994). Lektinler ve kullanım alanları. *Turkish Journal of Biology*, **18**, 39–45.
- Baytop, T. (1984). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. İstanbul. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No. 3255, Eczacılık Fakültesi, No.40; 371.

- Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70–76.
- Beppu, H., Nagamura, Y. ve Fujita, K. (1993). Hypoglycaemic and antidiabetic effects in mice of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger. *Phytotherapy Research*, **7**, S37-S42.
- Beppu, H., Koike, T., Shimpo, K., Chihara, T., Hoshino, M., Ida, C. ve ark. (2003). Radical-scavenging effects of *Aloe arborescens* Miller on prevention of pancreatic islet B-cell destruction in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**, 37–45.
- Beuth, J., Ko, H.L., Schirmacher, V., Uhlenbruck, G., Pulverer, G. (1988). Inhibition of liver tumor cell colonization in two animal tumor models by lectin blocking with D-galactose or arabinogalactan. *Clinical and Experimental Metastasis*, **6**, 115–120.
- Bird, G.W.G. (1959). Hemagglutinins in seeds. *British Medical Bulletin*, 165–168.
- Bloksma, N., Kuper, C.F., Hofnuis, F.M.A., Benaissa-Trouw, B., Willers, J.M.N. (1983). Antitumour activity of endotoxin concanavalin A and poly I: C and their ability to elicit tumour necrosis factor, cytostatic factors, and interferon *in vivo*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **16**, 35–39.
- Bolkent, S., Akev, N., Özsoy, N., Şengezer-Inceli, M., Can, A., Okyar, A. ve ark. (2004). Effect of *Aloe vera* (L.) Burm. f. leaf gel and pulp extracts on kidney in type-II diabetic rat models. *Indian Journal of Experimental Biology*, **42**, 48–52.
- Boyd, W.C. ve Shapleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **119**, 419.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. ve Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **28**, 25–30.
- Buege, J.A. ve Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, **52**, 302-310.
- Burçak, G. ve Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **35**, 159–169.
- Can, A., Akev, N., Özsoy, N., Bolkent, S., Arda, B.P., Yanardag, R. ve ark. (2004). Effect of *Aloe vera* leaf gel and pulp extracts on the liver in Type-II diabetic rat models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27**, 694–698.

- Capasso, F., Borrelli, F., Capasso, R., Di Carlo, G., Izzo, A.A., Pinto, L. ve ark. (1998). Aloe and its therapeutic use. *Phytotherapy Research*, **12**, 124–127.
- Champe, P.C. ve Harvey, R.A. (1997). *Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya*. (2nd ed.). A. Tokullugil, M. Dirican ve E. Ulukaya (Eds.), Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- Chatterjee, S.N. ve Agarwal, S. (1988). Liposomes as a membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, **4**, 51–72.
- Chaudière, J. ve Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 949–962.
- Chithra, P., Sajithlal, G.B. ve Chandrakasan, G. (1998). Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **59**, 179–186.
- Chun-hui, L., Chang-hai, W., Zhi-liang, X., Yi, W. (2007). Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. *Process Biochemistry*, **42**, 961–970.
- Cooper, M.E., Bonnet, F., Oldfield, M., Jandeleit-Dahm, K. (2001). Mechanism of diabetic vasculopathy: an overview. *American Journal of Hypertension*, **14**, 475–486.
- Corsi, M.M., Bertelli, A.A., Gaja, G., Fulgenzi, A., Ferrero, M.E. (1998). The therapeutic potential of *Aloe vera* in tumor-bearing rats. *International Journal of Tissue Reactions*, **20**, 115–118.
- Çandöken, E. (2006). *Aloe vera* ve Aloeler. Celal Bayar Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, Bitirme Tezi, Manisa.
- De Mejía, E.G. ve Prisecaru, V.I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 425–445.
- Desai, I.D. (1984). Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods Enzymology*, **105**, 138–147.
- Desantis, S., Corriero, A., Acone, F., Zubani, D., Cirillo, F., Palmiere, G. ve ark. (2003). Lectin histochemistry on the dorsal epidermis of the Breton dog. *Acta Histochemica*, **105**, 73–79.
- Dixon, H.B.F. (1981). Defining a lectin. *Nature*, **292**, 192.

- Defacqz, Ed. ve Weitz, R. (1928). "Dorvault" - *L'Officine ou Répertoire Général de Pharmacie Pratique*. (17th ed.). Paris : Vigot Frères éditeurs, 383-386.
- Duh, P.-D., Tu, Y.-Y. ve Yen, G.-C. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **32**, 269-277.
- Eshun, K. ve He, Q. (2004). *Aloe vera*: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 91-96.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. ve Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**, 872-879.
- Folin, O. ve Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **73**, 627-650.
- Freitas, J.P., Filipe, P.M. ve Rodrigo, F.G. (1997). Lipid peroxidation in type 2 normolipidemic diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **36**, 71-75.
- Gabius, H.-J. (1997). Animal lectins. *European Journal of Biochemistry*, **243**, 543-576.
- Ganguly, C. ve Das, S. (1994). Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. *Chemotherapy*, **40**, 272-278.
- Goldstein, I.J. ve Hayes, C.E. (1978). The Lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **35**, 127-340.
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, **285**, 66.
- Gribel, N.V. ve Pashinskiĭ, V.G. (1986). Antimetastatic properties of aloe juice. *Vopr Onkol*, **32**, 38-40.
- Grindlay, D. ve Reynolds, T. (1986). The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology*, **16**, 117-151.
- Grover, J.K., Yadav, S.P. ve Vats, V. (2003). Effect of feeding *Murraya koeingii* and *Brassica juncea* diet kidney functions and glucose levels in streptozotocin diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **85**, 1-5.
- Gül, N., Cebesoy, S. ve Ozsoy, N. (2008). Lectins binding during alloxan-induced diabetes soleus muscle. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 926-930.

- Ha, H. ve Kim, K.H. (1999). Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **45**, 147–151.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, M.C. (1984). Review article: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, **219**, 1–14.
- Halliwell, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **82**, 747–752.
- Halliwell, B. ve Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 71S-72S.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141**, 312–322.
- Heggors, J.P., Kucukcelebi, A., Stabenau, C.J., Ko, F., Broemeling, L.D., Robson, M.C., Winters, W.D. (1995). Wound healing effects of Aloe gel and other topical antibacterial agents on rat skin. *Phytotherapy Research*, **9**, 455–457.
- <http://www.aloeverafarms.com/images/aloe20%.photo.jpg>. [Eriřim 10.07.2008].
- http://www.worth1000.com/entries/140500/140544BHJG_w.jpg [Eriřim 11.07.2008].
- Hu, Y., Xu, J. ve Hu, Q. (2003). Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7788–7791.
- Hu, Q., Hu, Y. ve Xu, J. (2005). Free radical-scavenging activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, **91**, 85–90.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **53**, 1841–1856.
- Kanatt, S.R., Chander, R. ve Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, **100**, 451–458.
- Kardořov, A. ve Machov, E. (2006). Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia*, **77**, 367–373.
- Kato, S. ve Arai, Y. (1997). SOD of Kidachi aloe. *New Food Industry*, **39**, 1–8.
- Kılınç, K. ve Kılınç, A. (2002). Temel tıptan kliniğe. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **33**, 110–118.
- King, H., Aubert, R.E. ve Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, 1995 - 2025. *Diabetes Care*, **21**, 1415–1431.

- Koike, T., Beppu, H., Kuzuya, H., Maruta, K., Shimpō, K., Fujita, K. (1995). A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from 'Kidachi Aloe' (*Aloe arborescens* Miller var. *Natalensis* Berger). *Journal of Biochemistry*, **118**, 1205–1210.
- Koo, M.W.L. (1994). *Aloe vera*: antiulcer and antidiabetic effects. *Phytotherapy Research*, **8**, 461–464.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680–685.
- Lee, A.Y.W. ve Chung, S.S.M. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *The FASEB Journal*, **13**, 23–30.
- Lee, K.Y., Weintraub, S.T. ve Yu, B.P. (2000). Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 261–265.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (1993). *Principles of Biochemistry*. (2nd ed.). New York: Worth Publishers, Inc.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, **96**, 254–260.
- Liener, I.E. ve Hill, E.G. (1952). The effect of heat treatment on the nutritive value and hemagglutinating activity of soybean oil meal. *Journal of Nutrition*, **49**, 609–620.
- Lis, H. ve Sharon, N. (1972). Soybean (*Glycine max*) agglutinin. *Methods in Enzymology*, **28, Part B**, 366–368.
- Lis, H. ve Sharon, N. (1981a). Lectins in higher plants. *The Biochemistry of Plants*, **6**, 371–434.
- Lis, H. ve Sharon, N. (1981b). Affinity chromatography for the purification of lectins: a review. *Journal of Chromatography*, **215**, 361–372.
- Lis, H. ve Sharon, N. (1986). Biological properties of lectins. İçinde I.E. Liener, N. Sharon ve I.J. Goldstein (Ed.). *The Lectins*. Academic Press, 265–291.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265–275.
- Malkoç, S. (1997). *Aloe vera* L. Burm. f. (Sarısabır) yapraklarının jel kısmındaki lektin üzerine çalışmalar. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- Malkoç, S. ve Akev, N. (1999). Studies on *Aloe vera* L. Burm. f. leaf gel lectin. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **41**, 127–130.
- Malterud, K.E., Farbrot, T.L., Huse, A.E., Sund, R.B. (1993). Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology*, **47S**, 77–85.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C. ve Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, **32**, 595–603.
- Maxwell, S.R.J., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M.A., Thorpe, G.H.G. ve ark. (1997). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*, **27**, 484–490.
- Müftüoğlu, M. (2003). DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi*, **28**, 20–24.
- Nagata, M. ve Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, **39**, 925–928.
- Nowak, T.P., Kobiler, D., Roel, L.E., Barondes, S.H. (1977). Developmentally regulated lectin from embryonic chick pectoral muscle. Purification by affinity chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, **252**, 6026–6030.
- Okyar, A., Can, A., Akev, N., Baktır G., Sütülpınar, N. (2001a). Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in Type I and II diabetic rat models. *Phytotherapy Research*, **15**, 157–161.
- Okyar, A., Can, A., Akev, N., Baktır, G., Sütülpınar, N. (2001b). *Aloe vera* yapraklarının Tip II diabetic sıçanların kan şekeri düzeyine etkisi (kronik deneyler). İçinde E. Gürkan ve E. Tuzlacı (Ed.), *XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. Bildiri Kitabı*. İstanbul; Marmara Üniversitesi, No. 670, Eczacılık Fakültesi, No. 17; 281-286.
- Omeye, S.T., Turnbull, J.D. ve Sauberlich, H.E. (1971). Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods in Enzymology*, **62**, 3–11.
- Ozsoy, N., Yanardag, R., Can, A., Akev, N., Okyar, A. (2008). Effectiveness of *Aloe vera* versus glibenclamide on serum lipid parameters, heart and skin lipid peroxidation in type-II diabetic rats. *Asian Journal of Chemistry*, **20**, 2679–2689.

- Öner, N. ve Akev, N. (1979). Sodyum dodesil sülfatın proteine etki tarzı ve proteinin dördüncül yapısının aydınlatılmasında kullanılması. *Tıp Fakültesi Mecmuası*, **42**, 723–730.
- Öner, N. ve Akev, N. (1985). Relation entre activité hémagglutinante et partie glucidique de l'agglutinine des graines de soja. *İstanbul Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, **21**, 108–120.
- Özmen, D., Mutaş, I., Özmen, B., Menten, J., Bayındır, O. (1997). Lens lipid peroxides and glutathione concentrations in diabetic cataract. *Annals of Clinical Biochemistry*, **34**, 190–192.
- Özsoy, N., Yanardağ, R., Can, A., Akev, A., Okyar, A. (2002-2003). The effect of *Aloe vera* (L.) Burm. fil. on the antioxidant system in lenses of Type-II diabetic rats. *İstanbul Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, **36–36**, 83–88.
- Parihar, M.S., Chaudhary, M., Shetty, R., Hemnani, T. (2004). Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of *Withania somnifera* and *Aloe vera*. *Journal of Clinical Neuroscience*, **11**, 397–402.
- Pena, S.D., Gordon, B.B., Karpatis, G., Carpenter, S. (1981). Lectin histochemistry of human skeletal muscle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **29**, 542–546.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231–1237.
- Reische, D.W., Lillard, D.A. ve Eitenmiller, R.R. (2002). *Antioxidants*. (2nd ed., Revised and Expanded) C.C Akoh (Ed.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. New York, USA: Marcel Dekker Incorporated, 489–516.
- Reynolds, T. (Ed.). (2004). *Aloes, The Genus Aloe*, Medicinal and aromatic plants-industrial profiles. USA, CRC Press.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**, 152–159.
- Rüdiger, H. (1998). Plant lectins: more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat (Basel)*, **161**, 1–4, 130–152.

- Rybicki, E.P. ve Purves, M. (1996). SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). İçinde V.E. Coyne, M.D. James, S.J. Reid, E.P. Rybicki (Eds.), *Molecular Biology Techniques Manual* (3th ed.). University of Cape Town: Dept Microbiology.
- Sabeh, F., Wright, T. ve Norton, S.J. (1996). Isozymes of superoxide dismutase from *Aloe vera*. *Enzyme Protein*, **49**, 212–221.
- Saito, H. (1993). Purification and active substances of *Aloe arborescens* Miller and their biological and pharmacological activity. *Phytotherapy Research*, **7**, S14–S19.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y. ve Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, **89**, 569–575.
- Sasaki, T., Yamazaki, K., Yamori, T., Endo, T. (2002). Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *British Journal of Cancer*, **87**, 918–923.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 287–306.
- Sela, B.-A., Wang, J.L. ve Edelman, G.M. (1975). Isolation of lectins of different specificities on a single affinity adsorbent. *The Journal of Biological Chemistry*, **250**, 7535–7538
- Sharon, N. ve Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, **177**, 949–958.
- Sharon, N. ve Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **246**, 227–243.
- Sharon, N. ve Lis, H. (1990). Legume lectins -a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, **4**, 3198–3208.
- Seyrek, K. ve Bildik, A. (2001). Lektinler. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, **12**, 96–100.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**, 49–55.
- Stahl, W. ve Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1740**, 101–107.

- Suzuki, I., Saito, H., Inoue, S., Migita, S., Takahashi, T. (1979). Purification and characterization of two lectins from *Aloe arborescens* Mill. *Journal of Biochemistry*, **85**, 163–171.
- Tsuda, H., Matsumoto, K., Ito, M., Hirono, I., Kawai, K., Beppu, H. ve ark. (1993). Inhibitory effect of *Aloe arborescens* Miller var. *nataliensis* Berger (Kidachi aloe) on induction of preneoplastic focal lesions in the rat liver. *Phototherapy Research*, **7**, S43-S47.
- Uslan, H.A. (1988). Proteinlerin afinite kromatografisi. İçinde A. Telefoncu (Ed.), *Protein Yapısı ve Fonksiyonu*. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı; 46–57.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology, Concepts and Applications*. John Wiley and Sons.
- Weber, K. ve Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, **244**, 4406.
- Wilchek, M., Miron, T. ve Kohn, J. (1984). Affinity chromatography. *Methods Enzymology*, **104**, 1–55
- Winters, W. D., Benavides, R. ve Clouse, W. J. (1981). Effects of Aloe extracts on human normal and tumor cells *in vitro*. *Economic Botany*, **35**, 89–95.
- Winters, W.D. (1993). Immunoreactive lectins in leaf gel from *Aloe barbadensis* Miller. *Phototherapy Research*, **7**, S23-S25.
- Wu, J.H., Xu, C., Shan, C.Y., Tan, R.X. (2006). Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS–1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. *Life Sciences*, **78**, 622–630.
- Yagi, A., Kabash, A., Okamura, N., Haraguchi, H., Moustafa, S.M., Khalifa, T.I. (2002). Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Medica*, **68**, 957–960.
- Yongchaiyudha, S., Rungpitarangsi, V., Bunyapraphatsara, N., Chokeychaijaroenporn, O. (1996). Antidiabetic activity of *Aloe vera* L. juice. I. clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine*, **3**, 241-243.
- Zarkovic, N., Zarkovic, K., Grainca, S., Kissel, D., Jurin, M. (1997). The *Viscum album* preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumour-host relationship. *Anticancer Drugs and Supplement*, **1**, S17-S22.

Zhang, X.-f., Wang, H.-m., Song, Y.-li, Nie, L.-h., Wang, L.-f., Liu, B. ve ark. (2006). Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from *Aloe vera*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **16**, 949–953.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Eda	Soyadı	ÇANDÖKEN
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	20.02.1984
Uyruğu	T.C.	T.C. Kimlik No.	20432451652
E-mail	eda0014@hotmail.com	Telefon No.	05446650977

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora		
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı	2008
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Şehremini Anadolu Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lise)	2002

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı (Sınav yılı)	(Diğer) Puanı (Sınav yılı)
İngilizce	İyi	İyi	İyi	ÜDS 41,250 (2006)	İstanbul Üniversitesi Yabancı Dil Sınavı 68,75 (2006)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	49,358	54,943	52,153

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word	Çok iyi
Microsoft Office Power Point	Çok iyi
Microsoft Office Picture Manager	Çok iyi
Microsoft Office Excel	İyi
Paint	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Sertifikaları	Veren kuruluş	Tarih
Upper Intermediate Business English	Bilge Adam Bilgi Teknolojileri Akademisi	2008
Toplam Kalite Yönetimi	MATED (Manisa Teknik Elemanlar Derneği)	2008
TS EN ISO 22000 Güvenli Gıda Yönetim Sistemi (H.A.C.C.P.)	MATED (Manisa Teknik Elemanlar Derneği)	2008
Deney hayvanları laboratuvar uygulamaları	(DETAE) İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü	2007

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Basketbol, yüzme, satranç, metafizik ve kişisel gelişim ile ilgili konular.