

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**POLİETİLEN GLİKOL İLE KOMPOZİT OLUŞTURULAN RUTİN
VE KRİZİNİN 7, 12-DİMETİLBENZ [A] ANTRASENE MARUZ
BIRAKILAN SACCHAROMYCES CEREVISIAE L ÜZERİNDE
ANTIOKSİDAN ETKİLERİ**

Elif Sema TEMİZER

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ekim 2024

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**POLİETİLEN GLİKOL İLE KOMPOZİT OLUŞTURULAN RUTİN VE
KRİZİNİN 7, 12-DİMETİLBENZ [A] ANTRASENE MARUZ
BIRAKILAN SACCHAROMYCES CEREVISIAE L ÜZERİNDE
ANTIOKSİDAN ETKİLERİ**

Tez Yazarı

Elif Sema TEMİZER

Danışman

Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ

Ekim 2024

ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı:	Polietilen Glikol ile Kompozit Oluşturulan Rutin ve Krizinin 7, 12-Dimetilbenz [a] antrasene Maruz Bırakılan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L Üzerinde Antioksidan Etkileri
Yazarı:	Elif Sema TEMİZER
İlk Teslim Tarihi:	18.09.2024
Savunma Tarihi:	18.10.2024

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

	<i>İmza</i>	
Danışman:	Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Başkan:	Prof. Dr. Mustafa KARATEPE Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Doç. Dr. Sevinç AYDIN Munzur Üniversitesi, Mimarlık ve Güzel Sanatlar Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza

Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Polietilen Glikol ile Kompozit Oluşturulan Rutin ve Krizinin 7, 12-Dimetilbenz [a] antrasene Maruz Bırakılan *Saccharomyces cerevisiae* L Üzerinde Antioksidan Etkileri ” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

18.10.2024

Elif Sema TEMİZER



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek gerek konu seçimi gerekse çalışmalarımın yürütülmesi sırasında ilgisini esirgemeyen, fikir sağlayan, tecrübeleri ile yol gösteren, sayın Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ hocama çok teşekkür ederim. Çalışmamın laboratuvar analiz aşamalarında destekleriyle adeta ikinci bir tez danışmanımış gibi tezimin bütün aşamalarında yardımcı olan Öğr. Gör. Tuba OKUTAN' a teşekkürü bir borç bilirim ve son olarak her zaman beni destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP) tarafından **FF.24.01** protokol numaralı proje ile desteklenmiştir.

Elif Sema TEMİZER

ELAZIĞ, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLOLAR LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	7
2.1. Rutin ve Krizinin ile PEG'in Kompozitinin Hazırlanması:	7
2.2. DMBA çözeltisinin Hazırlanması:	7
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L. Kültür ortamının Hazırlanması	7
2.4. İnkübasyon sonunda yapılan işlemler;.....	9
2.5. Biyokimyasal Analizler	9
2.5.1. Protein Miktarının Ölçümü	9
2.5.2. MDA Miktarının Analizi.....	9
2.5.3. GSH ve GSSG'nin Analizi.....	10
2.5.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (GSH-Px).....	10
2.5.5. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi (GR).....	10
2.5.6. Katalaz Aktivitesi (CAT)	10
2.5.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)	11
2.5.8. Glutasyon -S-Transferaz Aktivitesi	11
2.5.9. Lipofilik Vitaminler ile Ergosterol Miktarlarının Analizi	11
2.5.10. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	12
2.5.11. Yağ Asitlerinin GC ile Analizi	12
2.5.12. İstatistik Analizi	12
3. BULGULAR.....	14
3.1. Rutin verilen grupların sonuçları	14
3.1.1. Rutin Verilen Grupların Total Protein, MDA, GSH Ve GSSG Sonuçları.....	14
3.1.2. Rutin Verilen Grupların Antioksidan Enzimlerin Sonuçları	15
3.1.3. Rutin verilen grupların Yağ asidi sonuçları.....	16
3.1.4. Rutin verilen grupların lipofilik moleküllerin sonuçları.....	23
3.2. Krizin Verilen Grupların Sonuçları	24
3.2.1. Krizin Grubunun Total Protein, MDA, GSH, GSSG Sonuçları	25
3.2.2. Krizin (Chrysin) grubunun Antioksidan Enzim sonuçları	27
3.2.3. Krizin verilen grupların yağ asidi sonuçları	28
3.2.4. Krizin verilen grupların yağ asidi sonuçları	30
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
4.1. Hücre yoğunluğu, Total protein, GSH, GSSG ve MDA Değerleri.....	33
4.2. Antioksidan Enzimler	35
4.3. Yağ Asitleri	36
4.4. Lipofilik özellikteki moleküllerin değişimi	41

KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

Polietilen Glikol ile Kompozit Oluşturulan Rutin ve Krizin 7, 12-Dimetilbenz [a] antrasene Maruz Bırakılan *Saccharomyces cerevisiae* L Üzerinde Antioksidan Etkileri

Elif Sema TEMİZER

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim 2024, Sayfa: xi + 46

Bu çalışmada flavonoid bileşenler olan Rutin ve Krizin'nin polietilen glikol (PEG) gibi suda çözünabilir yapılar ile kompozit oluşturularak 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (DMBA)'ya karşı *Sacchchromyces cerevisiae* L. üzerinde metabolik etkileri incelendi. Bu amaçla maya hücresindeki antioksidan enzimler, yağ asitleri, lipid peroksidasyon ve lipofilik moleküllerin değişimleri analiz edildi. Deney planlaması kontrol, DMBA, Rutin, Krizin, PEG, Susam yağı, DMSO ve kombinasyon grupları şeklinde yapıldı. 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen olarak bilinen DMBA kanserojen bir ajandır ve hem hücrel hem de deney hayvanı modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Deney sonuçlarına göre total protein miktarı, MDA, GSH ve GSSG düzeylerinin rutin verilen deney modelinde yükseldiği gözlemlendi, ancak sadece rutin verilen grupta ise azaldığı saptandı. Krizin verilen deney grubunda ise PEG, susam yağı ve kombinasyon gruplarında bu sonuçların farklı oranlarda yükseldiği belirlendi. SOD, CAT, GSHpx ve GST gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde kontrol grubuna göre rutin verilen grupların bütününde azalma olduğu tespit edildi. Krizin uygulanan gruplarda da CAT ve GST sonuçlarında azalma gözlemlendi. Yağ asidi sentetaz enziminin (FAS) son ürünü olan palmitik asit miktarı rutin verilen gruplardan DMBA, susam yağı ve kompozit oluşturulan gruplarda azaldığı ve diğer gruplarda da yükseldiği belirlendi. Rutin verilen deney gruplardaki gibi krizin verilen aynı deney gruplarında benzer sonuçlar gözlemlendi. Lipofilik moleküllerden ergosterol miktarı rutin verilen modelin DMBA grubunda önemli düzeyde yükseldiği halde, diğer gruplarda azaldı. Krizin verilen modelde ise DMBA, krizin ve PEG gruplarında artış gözlemlendi.

Sonuç olarak kültür ortamına ilave edilen rutin ve krizin ile diğer moleküller ve kompozitlerin *S. cerevisiae*'daki antioksidan enzimlerin aktivitesi, lipid peroksidasyon, FAS ve sterol CoA enzim ürünleri üzerinde etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Sacchchromyces cerevisiae* L., Antioksidan Enzimler, Polietilen Glikol, Rutin, Krizin

ABSTRACT

Antioxidant Effects of Rutin and Chrysin Compositated with Polyethylene Glycol on *Saccharomyces cerevisiae* L Exposed to 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene

Elif Sema TEMİZER

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

October 2024, Pages: xi + 46

In this study, the metabolic effects of flavonoid components such as Rutin and Chrysin against 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) were investigated on *S. cerevisiae* by forming composites with water-soluble structures such as polyethylene glycol (PEG). For this purpose, changes in antioxidant enzymes, fatty acids, lipid peroxidation and lipophilic molecules in the cell were analyzed. The experimental planning was made as control, DMBA, Rutin, Chrysin, PEG, Sesame oil, DMSO and combination groups. DMBA, known as 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene, is a carcinogenic agent and is widely used in both cellular and experimental animal models.

According to our experimental results, it was observed that the total protein amount, MDA, GSH and GSSG levels increased in the routine given experimental model, but it was found to decrease only in the routine given group. In the experiment group where chrysin was given, it was determined that these results increased at different rates in the PEG, sesame oil and combination groups. It was determined that the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GSHpx and GST decreased in all routine groups compared to the control group. A decrease in CAT and GST results was also observed in the chrysin-applied groups. It was determined that the amount of palmitic acid, the end product of fatty acid synthetase enzyme (FAS), decreased in the routine-applied groups of DMBA, sesame oil and composite groups and increased in the other groups. Similar results were observed in the experimental groups given the chrysin as in the experimental groups given the routine. While the amount of ergosterol from lipophilic molecules increased significantly in the DMBA group of the routine-applied model, it decreased in the other groups. In the chrysin-applied model, an increase was observed in the DMBA, chrysin and PEG groups.

As a result, it was concluded that the routine and chrysin added to the culture medium and other molecules and composites were effective on the activity of antioxidant enzymes in *S. cerevisiae*, lipid peroxidation, FAS and stearol CoA enzyme products.

Keywords: *Sacchromyces cerevisiae* L, Antioxidant enzymes, Polyethylene Glycol, Rutin, Chrysin.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Rutinin moleküler yapısı	1
Şekil 1.2. Krizin'in moleküler yapısı.....	2
Şekil 1.3. Polietilen glikolün (PEG) moleküler yapısı.....	3
Şekil 1.4. DMBA (7,12-Dimetilbenz [a] antrasen)'nin moleküler yapısı.....	4
Şekil 1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L. Kültür ortamından çekilen fotoğraf.....	5
Şekil 1.6. <i>S. cerevisiae</i> L'nin hücre yapısı	6
Şekil 3.1. Standart yağ asidi kromatogramı	19
Şekil 3.2. <i>S. cerevisiae</i> 'nin kontrol grubu peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı	19
Şekil 3.3. DMBA eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı...	20
Şekil 3.4. PEG eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı	20
Şekil 3.5. Rutin eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı	21
Şekil 3.6. Susam yağı eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı.....	21
Şekil 3.7. Susam yağı eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı.....	22
Şekil 3.8. DMBA+PEG+Rutin 50 eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı.....	22
Şekil 3.9. DMBA+PEG+Rutin 25 eklenen <i>S. cerevisiae</i> peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı.....	23
Şekil 3.10. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan MDA'nın standart kromatogramı	25
Şekil 3.11. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan MDA'nın kontrol grubuna ait kromatogramı	26
Şekil 3.12. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan GSH ve GSSG'nin DMBA grubuna ait kromatogramı.....	26
Şekil 3.13. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan D, E, K ve fitosterollerin standart kromatogramı	31
Şekil 3.14. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan D, E, K ve fitosterollerin susam yağı grubuna ait kromatogramı.....	31

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların spektrofotometrede ölçülen hücre yoğunluğu ve hücre peleti miktarı	14
Tablo 3.2. Gelişme ortamına Rutin flavonoidi eklenen grupların total protein, MDA, GSH ve GSSG miktarlarının değişimi	15
Tablo 3.3. Gelişme ortamına Rutin flavonoidi eklenen grupların SOD, Katalaz, GSHpx ve GST enzim aktiviteleri	16
Tablo 3.4. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki doymuş asidi oranlarının değişimi.....	16
Tablo 3.5. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki tek çift bağlı doymamış asidi (MUFA) oranlarının değişimi.....	17
Tablo 3.6. Gelişme ortamına Rutin flavonoidi eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki çok çift bağlı doymamış asidi (PUFA) ile toplam yağ asidi oranlarının değişimi	18
Tablo 3.7. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların ADEK vitaminlerinin miktarları	24
Tablo 3.8. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların sterol miktarları (µg/g hücre peleti)	24
Tablo 3.9. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların spektrofotometrede ölçülen hücre yoğunluğu ve hücre pelet miktarı	25
Tablo 3.10. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların total protein, MDA, GSH ve GSSG miktarlarının değişimi.....	27
Tablo 3.11. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların SOD ve Katalaz enzim aktiviteleri	27
Tablo 3.12. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların Glutatyon Redüktaz (GR) GSHpx ve GST enzim aktiviteleri	28
Tablo 3.13. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki doymuş asidi oranlarının değişimi	28
Tablo 3.14. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki tek çift bağlı doymamış asidi (MUFA) oranlarının değişimi.....	29
Tablo 3.15. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki çok çift bağlı doymamış asidi (PUFA) ile toplam yağ asidi oranlarının değişimi.....	30
Tablo 3.16. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların lipofilik vitaminlerin miktarları	32
Tablo 3.17. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların fitosterol miktarları	32

SİMGELER VE KISALTMALAR

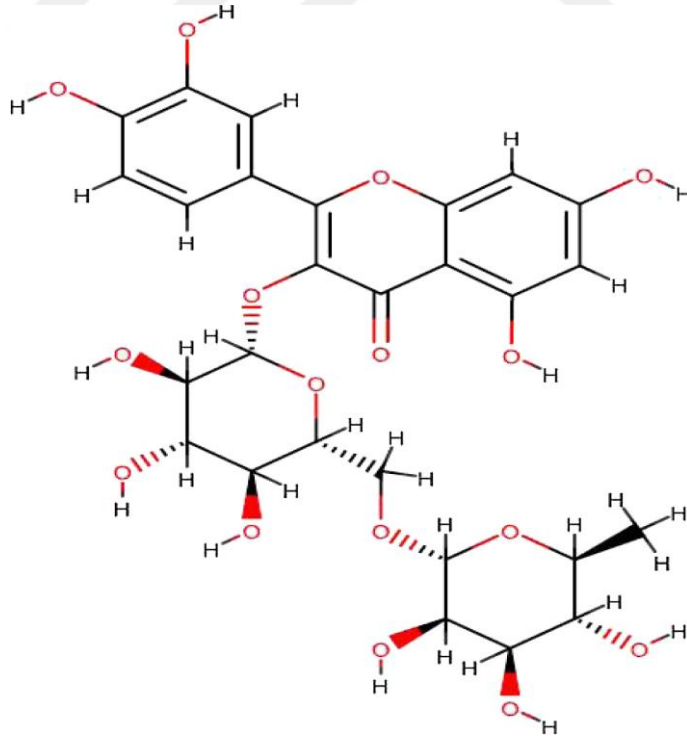
Kısaltmalar

ADH	: Alkol dehidrojenaz
ALDH	: Aldehit dehidrojenaz
CAT	: Katalaz
DMBA	: 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
MDA	: Malondialdehit
NaCl	: Sodyum Klorür
PEG	: Polietilen Glikol
SOD	: Süperoksit dismutaz

1. GİRİŞ

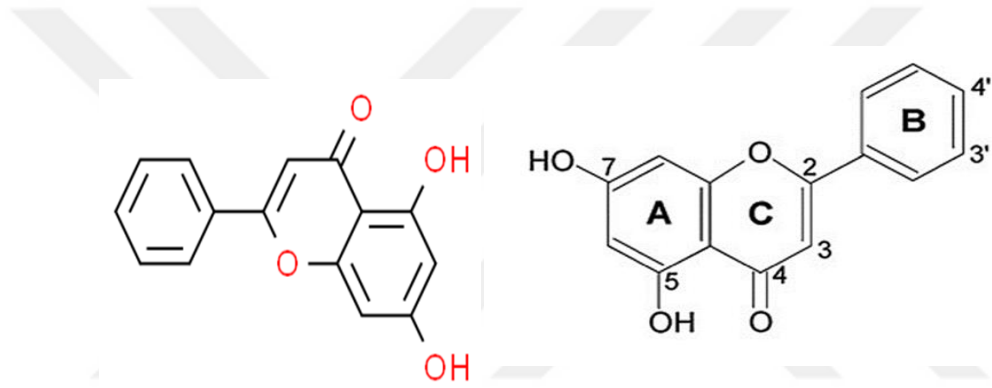
Flavonoidler bitkisel organizmaların yaprak, gövde, kök ve meyve kısımlarında yer alan sekonder metabolitlerdir. İnsan sağlığın korunması için flavonoidlerin diyetler ile alınması gereklidir. Flavonoidler içerisinde yer alan birçok bileşenin anti kanser etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte flavonoidlerin suda çözünürlükleri ve düşük absorpsiyon göstermeleri ve hızlı metabolize olmaları sonucu antikanser potansiyelleri üzerinde azaltıcı etkiye sahip olmaktadır [1]. Rutin ve krizin gibi flavonoidlerin PEG gibi suda çözünebilir ve toksik olmayan polimerler ile kompozit oluşturularak kanser ajanları üzerinde terapötik etkisinin artırılacağı düşünülmektedir. Anti kanser etkisi olan moleküller ile kompozit oluşturularak yapılan çalışmalar sınırlıdır ve metabolik olaylar bakımından ileri düzeyde değildir. Kompozit ve konjugasyon şeklinde moleküler yapılar geliştirilerek hedef dokularda oluşan kanser etkileşimleri engellenebilir.

Rutin, esas olarak meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve diğer birçok bitki bazlı insan diyetinde bulunan eşsiz bir antioksidan flavonoid maddedir. Rutin, yaygın bir diyet flavonoididir ve bağırsak mikrobiyotası onu absorbe edilebilecek çeşitli bileşiklere metabolize ettiğinden, çok az veya hiç diyet rutini bozulmadan emilir. Alt bağırsağın mikrobiyotası, rutini aglikonuna, uarsetin'e ve daha sonra ince bağırsak duvarı tarafından emilen şeker kalıntısına hidrolize eder. Rutinin moleküler yapısı Şekil 1.1.' de gösterilmiştir [2].



Şekil 1.1. Rutinin moleküler yapısı [2]

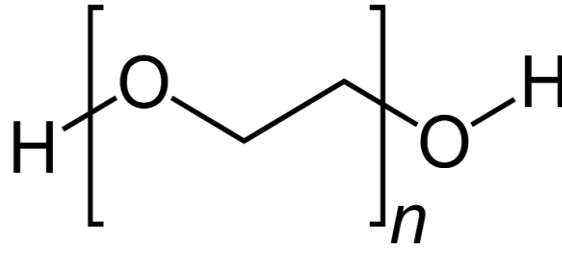
Krizin, balda, propoliste ve meyvelerde bulunan doğal polifenolik bileşiktir. Krizinin oksidatif stresin önlenmesi, inflamasyon, nörodejenerasyon ve karsinogenez dâhil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. İnsanların besin zincirinin bir parçası olan krizin, kanserler, diyabet ve Alzheimer veya Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar dâhil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesinde kullanılmaya aday bir flavonoid bileşik olarak kabul edilmektedir. Flavonoidler, hâlihazırda tanımlanmış 5.000'den fazla bileşik ile en önemli polifenolik sınıfı oluştururlar. Flavonoidler, antibakteriyel, antienflamatuar, antialerjik, antitrombotik ve damar genişletici etkiler dâhil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkiler sergileyen doğal antioksidanlardır. Krizin (5,7-dihidroksiflavon), güçlü anti-enflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğundan hücre döngüsü ilerlemesini bozarak hücre ölümünü destekler [3]. Krizinin moleküler yapısı Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Krizin'in moleküler yapısı [3]

Polietilen glikol ($H_3(O-CH_2-CH_2)_n-OH$) (PEG), bilinen polimerler arasında proteinler ve hücreler tarafından emilimi en düşük olan polimerdir. PEG, oda sıcaklığında su, etanol gibi en yaygın çözücülerde kolayca çözünür ve toksik değildir, insan vücuduna zarar vermez ve tahriş etmez, iyi bir biyouyumluluğa sahip olan PEG, kaygan bir yapıda olup nem tutma özelliğine sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı çeşitli endüstrilerde geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Polietilen glikoller (PEG), gıda, ilaç ve kozmetikte yaygın olarak katkı maddesi olarak kullanılan polieter bileşikleridir [4]. Makrogol olarak da bilinen polietilen glikol (PEG), etilen oksidin halka açma polimerizasyonundan türetilen etoksi birimlerinden oluşan bir polieterdir [5]. PEG endüstride kullanımı nedeniyle kanalizasyon sistemlerine ulaşabilir [6]. Çok miktarda oksijen atomu ve hidroksil grubu içerir ve her ikisi de hidrojen bağı oluşturabilir [7]. PEG'nin metabolizma süreci, alkol dehidrojenaz (ADH) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) yoluyla ardışık oksidasyonu içerir. Polietilen glikolün yapısı Şekil 1.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Polietilen glikolün (PEG) moleküler yapısı

PEG kullanımına, çoğu gastroenteroloji alanında olmak üzere birçok tıbbi uygulama alanlarında rastlanmaktadır. Polimerik nanopartikül hazırlığı sırasında, PEG bir stabilizatör olarak kullanılabilir veya hedef ligandların nanopartiküllerin yüzeyine konjugasyonu için bir bağlayıcı olarak uygulanabilir. İlaç taşıyıcılarının suda çözünür PEG ile modifikasyonu, hazırlanan nano araçların *in vivo* dolaşım yarı ömründe önemli bir artışa neden olabildiği ifade edilmiştir [8].

PEG'in insanlarda metabolize olduğuna dair bir bilgiye rastlanmamaktadır. Sınırlı absorpsiyondan kaynaklanan herhangi bir farmakolojik etki veya doğrulanmış toksisitelerin bulunmadığı ifade edilmiştir [9] oral olarak uygulanan PEG-3350'nin sağlıklı genç ve yaşlı deneklerde minimum düzeyde emildiğini, hızla atıldığını ve birincil olarak da dışkı yoluyla atıldığını gözlemişlerdir. Ancak aktif bileşen olarak PEG-350 içeren Tween 80'in bir hormon/östrojen aktif maddesi gibi davranma potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir [10]. Dişi sıçanların yenidoğan döneminde PEG-350'ye maruz kalması, cinsel olgunlaşmalarını önemli ölçüde hızlandırmış, östrus döngüsünü uzatmış ve kalıcı vajinal östrusa neden olmuştur.

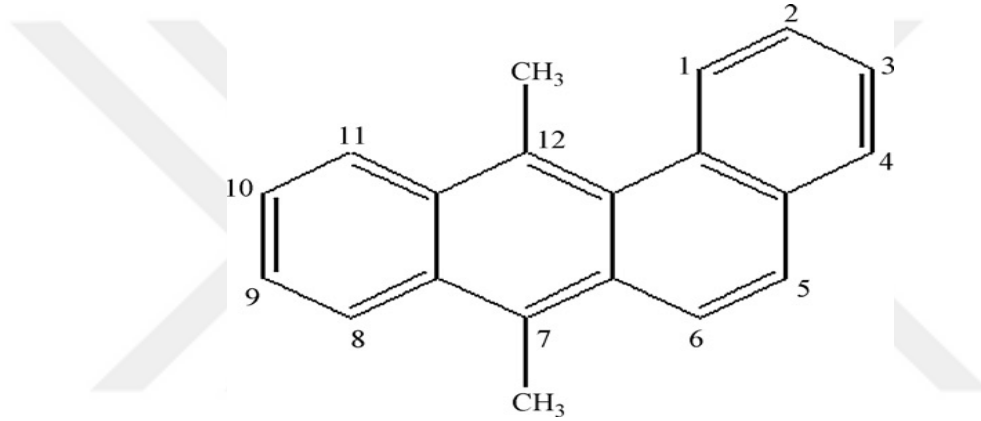
Birçok bitkisel besinde bulunan flavonoidler (kuarsetin, kaempferol, krizin, naringenin, genistein, rutin vb.) ve terpenoidler (artemisinin, taksol, digitoksin, azadarachtin, kafur, limonen vb) gibi bileşikler, sağlık üzerinde olumlu etkileri olan ve kanser, kalp-damar hastalıkları ve diyabet gibi hastalıkların tedavisinde avantaj sağlayabilecek olan nutrasötikler alanında da önem kazanmıştır [11].

Rutin, esas olarak meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve diğer birçok bitki bazlı insan diyetinde bulunan eşsiz bir antioksidan flavonoiddir. Rutinin diğer kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyonu, ilaç direncini ve kemoterapi yan etkilerini azaltarak tümör hücrelerinin önlenmesinde fayda sağlayabilir. Ayrıca rutin, töröpatik k ajan ile sinerjistik olarak apoptozu indüklediği belirtilmiştir [12].

Fitobileşenler olarak tanımlanan bitkilerin sekonder metabolitleri, birçok antikanser ajanın en belirgin kaynağı olarak ortaya çıkmış ve kanser tedavisi için sentetik kemoterapötik ajanlara bir alternatif teşkil etmiştir. Geniş bir yelpazede fitobileşenler, özellikle biyoflavonoidler, çeşitli kanserlere karşı potansiyel antikanser aktiviteler göstermiştir. Krizin geniş spektrumlu antikanser aktiviteye sahip böyle bir doğal, bitki bazlı biyoflavonoiddir [13]

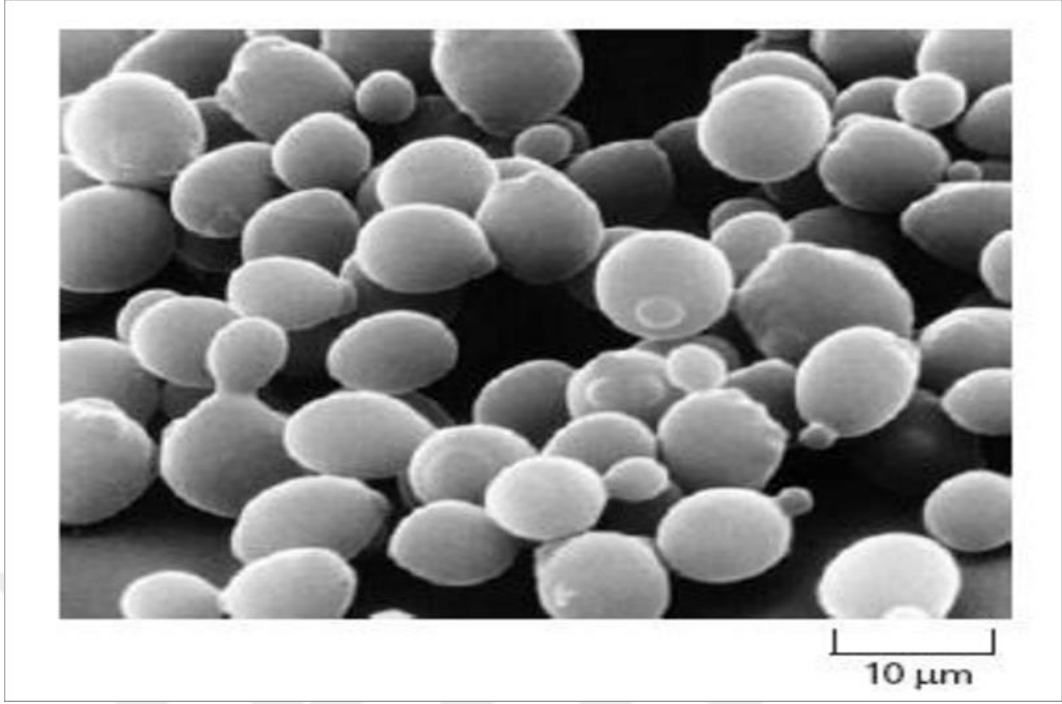
Krizin, *Passiflora caeruleae* ve *Passiflora incarnata* bitki türlerinde, bal ve propolis bulunur. Krizin ile yapılan bazı çalışmalarda hücre proliferasyonu, inflamasyon, anjiyogenez ve kanser metaztasına bağlı seçici hücre sinyal mekanizmaları yoluyla potansiyel antikanser etkilerini gösterdiği belirtilmiştir. Krizinin meme, akciğer, mesane, tiroid, prostat, kolon vb. gibi çeşitli kanserlere karşı etkili olduğu saptanmıştır [13].

7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) en yaygın kullanılan polisiklik aromatik hidrokarbonlardan biridir, DMBA, ait olduğu kimyasal sınıfın diğer üyeleri ile karşılaştırıldığında, en güçlü kanser ajanlarından biri olarak tanınmaktadır. DMBA, sitotoksik, kanserojen, mutajenik ve immünoşüpresif bir ajan olarak bilinmektedir. Yüksek derecede toksik bir kimyasal olan 7,12-Dimetilbenz (a) antrasen (DMBA), hayvan deneylerinde tümörlerin uyarılması için sıklıkla kullanılmaktadır [12]. DMBA'nın moleküler yapısı Şekil 1.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. DMBA (7,12-Dimetilbenz [a] antrasen)'nin moleküler yapısı [12]

Saccharomyces cerevisiae L. hücre biyolojisindeki temel çalışmalar için yaygın olarak kullanılan tek hücreli ökaryotik model organizmadır. Şekil 1.5.'de *S. cerevisiae*'nin kültür ortamındaki hücre yoğunluğu ve Şekil 1.6.'da hücre yapısı ve organelleri gösterilmiştir. *S. cerevisiae* hücrelerinin kısa yaşam döngüsüne sahip oldukları, ökaryotik hücrelerin karakteristiği olan bütün hücresel süreçlere sahip oldukları ve genomik yapılarının kolayca manipüle edildiği bilinmektedir. Bu sebeple apoptosis, yaşlanma ve toksisite mekanizmalarını araştırma bağlamında oksidatif stres ve etkilerinin incelenmesi için en çok tercih edilen deneysel modellerden biri haline gelmiştir [14].

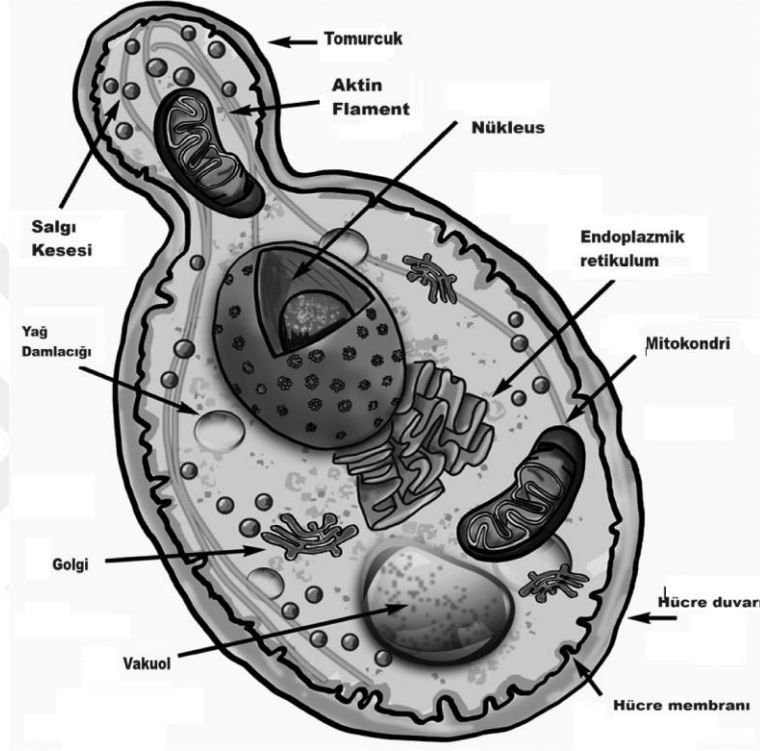


Şekil 1.5. *Saccharomyces cerevisiae* L. Kültür ortamından çekilen fotoğraf

Flavonoidler üzerinde en çok çalışılan antikanser ve kanseri önleyici ilaçlar arasındadır. Çeşitli araştırmalar, rutin'in çeşitli kanserlere karşı antikanser, kemopreventif ve kemo-duyarlılaştırıcı özelliğinin etkili olduğu bildirilmiştir. Polietilen glikol birçok medikal uygulamalarda kullanılan farklı polimerik özellikte bir maddedir. DMBA ise farklı deneysel çalışmalarda kuvvetli bir kanser oluşturuıcı ajandır. Çalışma planımızda DMBA verilen *S. cerevisiae* gruplarına hem bireysel düzeyde hem de kompozit düzeyde Rutin, Rutin+PEG, Krizin, Krizin+PEG verilerek kanser oluşturuıcı ajana karşı metabolik etkinlikler araştırılmıştır. Bu şekilde kanser oluşturuıcı veya oksidatif stres oluşturuıcı ajana karşı yeni bir moleküler sistem ve koruyucu sistemin geliştirilmesinin yolu açılmıştır. Çalışma planımıza bu açıdan bakıldığında özgün değerin yüksek olduğu düşünülmüştür.

Hücrelerde veya organizmalarda canlılık devam ettikçe reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması olağan bir durumdur. Ökaryotik hücreler ve yüksek yapılı organizmalar, hücrelerinde oluşan bu ROS moleküllerini ya kendi içindeki endojen antioksidan moleküller tarafından ya da dışarıdan eksternal eksojen antioksidan moleküller etkisiz hale getirilirler. Antioksidan maddeler içeren bitki ve / veya gıda tüketimi, vücudun oksidatif hasarı azaltmasına yardımcı olabilir. Terpenler, flavonoidler, tanenler ve fenolik asitler doğal antioksidan moleküllerdir. Doğal antioksidan moleküller besin zinciri içinde alınırlar ve vücuttaki zararlı birçok biyokimyasal reaksiyonlarda oluşan serbest radikallere karşı kullanılırlar. Ancak konsantrasyon durumuna göre prooksidan etki gösterenler de vardır. Bu çalışmada flavonoid yapıda olan Rutin ve Krizin kanser ajanı olan DMBA

molekülüne karşı bireysel ve PEG ile kompozit oluşturularak kullanılmıştır. Çalışmadan çıkarılacak sonuçlar doğrudan insanların sağlığı ilişkili olduğu için yaygın etkisinin de önemli ve yüksek olacağı düşünülmektedir. Çalışmada hücre modeli olarak *Saccharomyces cerevisiae* L. kullanmamızın nedeni, bu maya hücresinin biyokimyasal, moleküler biyoloji ve genetik ile ilgili bilimsel çalışmalarda model hücre olarak kabul edilmesi ve buradan çıkan sonuçların insanlar üzerinde uygulanacak sonuçlarla paralel olmasından dolayıdır. (Şekil 1.6.)



Şekil 1.6. *S. cerevisiae* L'nin hücre yapısı

Bu tez çalışmasında flavonoid bileşiklerinden rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozit), ve krizin (5,7-dihidroksiflavon) ile kompozit oluşturulan polietilen glikolün (PEG) 7,12-DMBA verilen *Saccharomyces cerevisiae* L. üzerindeki metabolik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. PEG etilen oksit monomerlerinden meydana gelen sentetik bir polimerdir. Rutin birçok bitki ve meyvede bulunan flavonoid bileşenlerden biridir. Kanseri önleme ve tedavi etmede diğer bazı biyokimyasal aktiviteleri ile oldukça güçlü antioksidan ajanlardan biridir. Krişin, merkezi aromatik halkada bir çift bağ içeren flavon ailesinin bir parçasıdır. Bazı bitkilerde, balda ve propoliste yüksek oranda bulunan bir flavon aglikondur.

Krişin içeren diyet takviyelerinin depresyon, anksiyete, hipertansiyon ve kanseri tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir. Ayrıca krişin, aromataz enzimini inhibe ettiğinden testosteron seviyelerini korumak için kullanıldığı ileri sürülmüştür.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Rutin ve Krizinin ile PEG'in Kompozitinin Hazırlanması:

100 mg Rutin ve Krizin % 25 ve %50 oranında PEG ile 37 °C 'de 1 saat süresince karışmaları sağlanarak iki farklı oranda Rutin +PEG ve Krizin+PEG kompozit oluşturulmuştur.

2.2. DMBA çözeltisinin Hazırlanması:

7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) kanserojen bir maddedir. Deneysel olarak deney hayvanları üzerinde farklı kanser türlerinin oluşturulması için kullanılmaktadır. Bu çalışmada DMBA'yı çözmek için susam yağı kullanılmıştır.

2.3. *Saccharomyces cerevisiae* L. Kültür ortamının Hazırlanması

10 g peptone water, 10 g yeast ekstraktı ve 20 g D-Glukoz 1 L'lik saf su içerisinde ultrasonik su banyosunda ultrasonik dalgalar ile çözündürülmüştür. Daha sonra, 250 ml'lik şişelere etiketleme yaparak eşit şekilde aktarılmıştır. Her bir şişeye 200 ml besiyeri ilave edilmiştir. Bu işlemin ardından sterilizasyon için 121 ° C'ye programlanan otoklavda 15 dakika bekletilecektir. Soğutulduktan sonra steril ortamda 1 ml stok maya hücresi ilave edilerek 30 °C'deki inkübatörde konularak 72 saat süresince inkübe edilmiştir. Çalışma planında aşağıdaki gruplar oluşturulmuştur.

Kontrol Grubu (K)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ilave edilerek ve 72 saat 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) Grubu

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanacaktır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL (20 mg DMBA) ilave edilerek ve 72 saat 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Rutin Grubu (R)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 24 mg rutin ilave edilerek ve 72 saat 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Krizin Grubu (KR)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamında kullanılmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 24 mg krizin ilave edilerek ve 72 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Polietilen Grubu (PEG)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamında kullanılmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 20 mg PEG ilave edilerek ve 72 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Kontrol Grubu DMSO (KDMSO)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL DMSO ilave edilerek ve 72 saat 30 C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Susam Yağı Grubu

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su 2 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL susam yağı ilave edilerek ve 72 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

DMBA + Rutin + PEG Grubu (%25)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL DMSO (20 mg DMBA/200 mL) ve 20 mg 25’lik R+PEG ilave edilerek ve 72 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

DMBA + Rutin + PEG Grubu (%50)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL DMSO (20 mg DMBA/200 mL) ve 20 mg 50’lik R+PEG ilave edilerek ve 72 saat 30 C’de inkübasyona bırakılmıştır.

DMBA + Krizin + PEG Grubu (% 25)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL DMSO (20 mg DMBA) ve 20 mg 25’lik KR+PEG ilave edilerek ve 72 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

DMBA + Krizin + PEG Grubu (% 50)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonundan sonra, 1 ml stok *S. cerevisiae* kültüründen ve 100 µL DMSO (20 mg DMBA/200 mL) ve 20 mg 50'lik K+PEG ilave edilerek ve 72 saat 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

2.4. İnkübasyon sonunda yapılan işlemler;

Bütün gruplar 30 C'de 72 saat inkübasyona bırakılıp, kültür ortamındaki hücrelerin yoğunluğu 600 nm de spektrofotometrede ölçülüp belirlenmiştir. Bu işlemten hemen sonra her kültür ortamındaki hücreler steril falkon tüplerine alınıp 8000 rpm'de ve +4 °C'de santrifüj edilip hücre peletleri toplanmıştır. Daha sonra hücre peletleri % 0,9'luk NaCl çözelti ile yıkanarak kültür sıvısı atıklarından temizlenerek ve peletlerinin yıkama işleminden sonra yaş ağırlıkları belirlenerek fosfat ve TRIS-EDTA tamponu (pH=7.4) tamponu ile homojenize edilip aşağıdaki biyokimyasal işlemler yapılmıştır.

2.5. Biyokimyasal Analizler

2.5.1. Protein Miktarının Ölçümü

Örneklerin protein miktarı spektrofotometrik olarak Lowry vd. (1951) tarafından ortaya sunulan metoda uygun ölçülmüştür [15]. Alınan örneğe Lowry çözeltisi eklenmiştir ve 10 dk beklenmiştir, süre sonunda su ile 1/1 (v/v) seyreltilmiş folin reaktifi ilave edilmiştir. 30 dk sonra 660 nm dalga boyunda UV'de blank'a karşı örneklerin absorbansları okunmuştur. Bovin serum albümin standart olarak kullanılmıştır. Sonuçlar mg/g olarak ifade edilmiştir.

2.5.2. MDA Miktarının Analizi

Bu işlem için örneklerin süpernatant kısımdan 1 ml alınmış ve üzerlerine %10'luk perklorik asit (PCA) eklenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Bu karışım tekrar 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, elde edilen süpernatant kısım otosampler viallere alınmış ve analizler Shimadzu (Kyoto, Japan) marka HPLC cihazında analizi yapılmıştır. Mobil faz olarak 30 mmol KH₂PO₄ ve metanol karışımı (% 82-% 18, H₃PO₄ ile pH=3.6). kolon olarak da ODS-3 kolonu (150 mm x 4.6, 5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1,0 ml/dk ve DAD dedektörünün dalga boyu 254 nm'de belirlenmiştir [16].

2.5.3. GSH ve GSSG'nin Analizi

Öncelikle örneklerden 1 ml alınmıştır. Üzerine %10'luk PCA eklenmiş ve proteinler çöktürülmüştür ve bu elde edilen karışım öncelikle 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatant olan kısımları otosampler viallerine alınmıştır. Analizler için HPLC cihazı kullanılmıştır. Analiz için Mobil faz olarak 50 mmol NaClO₄ (% 0,1 H₃PO₄) tamponu kullanılmıştır. Analiz için ODS-3 HPLC kolonu (150 mm x 4.6, 5µm) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1,0 ml/dk ve DAD dedektörünün dalga boyu 215 nm olarak belirlenmiştir. Analizler Lab Solution 5.67 (Kyoto, Japan) programı kullanılarak hesaplanmıştır [17].

2.5.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (GSH-Px)

2,9 mL K-Na tamponu (pH= 7.0), 100 µl hücre homojenatı, 200 µl 4 mM GSH ilave edildikten sonra 1 dakika bekletilmiştir. Karışım içine 200 µl 2 mM H₂O₂ ilave edilerek 37°C'de reaksiyon başlatılmıştır. 10 dakika sonra karışım içine %8'lik MPA ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. 100 µl DTNB ilave edilerek ortamdaki GSH ile DTNB (5,5'-ditiyobis-2- nitrobenzoik asit)'nin reaksiyonu sonucunda oluşan GSTNB ve TNB sarı renli ürünler 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar GSH standarttı kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile hesaplama yapılarak unit/dk/pelet olarak bulunmuştur [18,19,20].

2.5.5. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi (GR)

GR Enziminin aktivitesi, Smith vd. tarafından belirtilen metoda göre yapılmıştır [21]. 2,9 mL K-Na tamponu (pH= 7.2), 100 µl hücre homojenatı, 200 µl 4 mM GSSG ilave edildikten sonra 1 dakika bekletilmiştir. Karışım içine 200 µl 3 mM NADPH ilave edilerek 37°C'de reaksiyon başlatılmıştır. 10 dakika sonra karışım içine %8'lik MPA ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Son olarak 100 µl DTNB ilave edilerek ortamdaki GSH ile DTNB nin reaksiyonu sonucunda oluşan GSTNB ve TNB sarı renkli ürünler 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar GR enzim konsantrasyonuna göre oluşturulan kalibrasyon grafiği ile hesaplama yapılmış ve GR enzim miktarı µg protein/dk/pelet olarak bulunmuştur.

2.5.6. Katalaz Aktivitesi (CAT)

CAT aktivitesi Korolyuk ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır [22]. 50 mM/L Na-K fosfat tamponu (pH= 7.4) içinde 20 mM H₂O₂ seyreltilmiş ve tüplere alınan 100 µl homojenatın üzerine ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. 3 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra enzim aktivitesini durdurmak amacıyla 4 mL 32,4 mmol/L amonyum molibdat ilave edilmiştir. Absorbanslar blanka karşı 374 nm'de okunmuştur. Sonuçlar H₂O₂ konsantrasyonlarıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile hesaplama yapılarak unit/dk/pelet olarak bulunmuştur.

2.5.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)

SOD aktivitesi için, 1988 yılında Sun vd. tarafından sunulan yöntem kullanılmıştır [23]. 0,3 mM Xantin, 0,6 mM EDTA, 150 µg/L NBT, 400 mM Na₂CO₃ ve 1 g/L Bovine serum albumin birleştirilerek hazırlanan reaktif, 100 µl homojenat ve 50 µl 167 U/ml Xantin oksidaz (XO) enzimi eklenmiştir. 25°C’de 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 100 µl 10 mmol CuCl₂ ilave edilmiş, daha sonra %8’lik MPA ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Blanka karşı 560 nm’de absorbanslar okunmuştur. Enzim aktivitesi IU.ml⁻¹ cinsinden hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır. Aktivite = (A1-A2)/A1 x 100.

2.5.8. Glutasyon -S-Transferaz Aktivitesi

GST aktivitesi ölçümü için tüp içine 2,9 mL K-Na tamponu (pH= 6.5), 100 µl hücre homojenatı, 200 µl 4 mM GSH ilave edildikten sonra 1 dakika bekletilmiştir. Karışım içine 50 µl 100 mM CDNB ilave edilerek 37 °C’de reaksiyon başlatılmıştır. 10 dakika sonra karışım içine %8’lik MPA ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. CDNB konjugatı oluşturmayan GSH miktarı DTNB (5,5’-ditiyobis-2- nitrobenzoik asit)’nin reaksiyonu sonucunda oluşan GSTNB ve TNB sarı renli ürünler 412 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar GSH standarttı kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile hesaplama yapılarak unit/dk/pelet olarak bulunmuştur [19,20,21,22].

Lipidlerin Ekstraksiyonu

Maya pelleti örneklerinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan izopropanol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin [23] metoduyla yapıldı. Bunun için: Hücre pelletleri Micra–D.8 homojenizatöründe 11000 rpm’de 30 sn ile 3:2 (v/v) oranında 10 ml hekzan-izopropanol ile parçalandı. Homojenizasyon kabı 2 ml HIP karışımı ile yıkandı ve santrifüj tüplerine alındı. Daha sonra 4500 rpm’de 10 dk süre ile santrifüj edilen örneklerin üst süpernatant kısmı alınarak lipofilik vitaminler ve yağ asidi metil esteri içi aşağıdaki işlemler uygulandı.

2.5.9. Lipofilik Vitaminler ile Ergosterol Miktarlarının Analizi

Lipofilik vitaminler için alınan örneklerin bulunduğu deney tüpü üzerine % 10’luk KOH çözeltisi eklenmiştir. Bu örnekler önce vortekslenmiştir. Vortekslendikten hemen sonra 85 °C’de 15 dk süre tutulmuştur. Tüpler oda sıcaklığı seviyesinde soğutulmuştur. Daha sonra üzerlerine saf su eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra lipofilik moleküller 5 mL hekzan eklenerek ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı azot gazı şeklinde uçurulmuştur. Alttaki tortu öncelikle 1,0 mL (% 60 + % 40, v/v) asetonitril/metanol içerisinde çözülmüştür ve daha sonra viallere alınmıştır. Analiz için kullanılan cihaz Shimadzu marka HPLC cihazıdır. Analiz için, Asetonitril/Metanol (% 88+%12, v/v) karışımı mobil faz olarak kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk olarak kullanılmıştır. A, D, E ve K

vitamin analizi için PDA-UV dedektörü kullanılmıştır. Kolon olarak da Wakosil II kolonu kullanılmış, A vitamini için dedeksiyonunun dalga boyu 326 nm, E, D, K vitaminleri ve fitosteroller için 202 nm olarak belirlenmiştir [24].

2.5.10. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Yağ asidi bileşimi içindeki yağ asitlerinin metil esterinin hazırlanması için 5 Ml hıp karışımı alındı ve % 2'lik metanolik sülfürik asit eklendi. Bu örnekler vortekslenerek ile iyice karıştırıldı. Bu karışım 55 °C'de 15 saat metillasyon reaksiyonuna bırakıldı. 15 saat süre geçtikten sonra, tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Örneklerin üzerine % 5'lik NaCl ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri (FAMES) hekzan kullanılarak ekstre edilmiş ve üstte kalan hekzan fazı pipetle alınıp üzerine % 2'lik KHCO₃ eklendi. Fazların ayrılması amacıyla 4 saat beklenildi [25]. Daha sonra metil esterlerini içeren karışımlar, 45 °C'de, azot gazı ile çözücüleri uçuruldu. Tüp içinde kalan kalıntı kısmı yani FAMES molekülleri 1 mL kloroformda çözüldü. Daha sonra örneklerdeki yağ asidi metil esterlerini analiz etmek amacıyla Shmadzu GC 2010 Plus gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır.

2.5.11. Yağ Asitlerinin GC ile Analizi

FAMES analizi için kolon sıcaklığı 90–218 °C, enjeksiyonun sıcaklığı 240 °C ve dedektörün sıcaklığı 280 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Kolonun sıcaklığını ayarlayan program 138 °C 'den 218 °C 'ye ayarlanmıştır. Sıcaklığın artışı önce 200 °C 'ye kadar 5 °C/dk daha sonra 200 °C'den 220 °C 'ye kadar 4 °C / dk olarak belirlenmiştir. 218 °C 'de 8 dakika tutulmuştur. Daha sonra toplam süre 28 dakika olarak belirlenmiştir. Taşıyıcı gaz için de Helyum gazı seçilmiştir. Analiz esnasında örneklerle ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerinin karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlenmiştir [27]. Yağ asidi metil esterlerinin % miktarı Lab Solutions LC/GC 5.91 işletim programı (Shimadzu, Kyota, Japonya) kullanılarak hesaplandı.

2.5.12. İstatistik Analizi

Gruplar arasındaki istatistik anlamlılığı belirlemek için ANOVA tek yönlü varyans analizi ve gruplar arasında kıyas yapmak için LSD testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiş ve veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmiştir.

Tablolarda istatistik olarak verilen a simgesi ($p > 0,05$) gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel anlamda anlamlı olmadığını gösterir. b simgesi ($p < 0,05$) gruplara dair farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu gösterir. c simgesi ($p < 0,01$) gruplara dair farklılık istatistiksel olarak daha

anamlı olduğunu, d simgesi ($p<0,001$) gruplara dair farklılık istatistiksel anlamda daha fazla anlamlı olduğunu ifade etmektedir.



3. BULGULAR

3.1. Rutin verilen grupların sonuçları

Gruplar hazırlandıktan sonra ve stok kültürden 1 ml *S. cerevisiae* hücre popülasyonu ilave edilip ilgili gruplara PEG, DMBA, DMSO ve Rutin ilavesinden sonra 72 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılıp 600 nm’de hücre yoğunluğu ölçüldü. Tablo 1’deki sonuçlarda görüldüğü gibi hücre yoğunluğu açısından gruplar arasında belirgin bir farklılık bulunmadı. Santrifüj sonrasında elde edilen yaş hücre peletlerinin miktarında kontrol grubuna göre farklı oranlarda yükseldiği belirlendi ($p<0,05$, $p<0,01$) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların spektrofotometrede ölçülen hücre yoğunluğu ve hücre peleti miktarı

Gruplar	ABS (600 nm)	Pelet miktarı (g)
Kontrol	1,91 ±0,04 ^a	0,84 ±0,02
DMBA	1,95 ±0,02 ^a	1,18 ±0,11 ^b
Rutin	1,94 ±0,05 ^a	1,49 ±0,05 ^c
PEG	1,93±0,02 ^a	1,31 ±0,13 ^c
Susam Yağı	1,99 ±0,01 ^a	1,15±0,02 ^b
DMSO	1,86 ±0,02 ^a	1,24±0,05 ^b
DMBA+PEG+Rutin 25	1,94 ±0,01 ^a	1,37±0,06 ^c
DMBA+PEG+Rutin 50	1,89 ±0,02 ^a	1,19 ±0,08 ^b

3.1.1. Rutin Verilen Grupların Total Protein, MDA, GSH Ve GSSG Sonuçları

Tablo 3.2’de verilen sonuçlarda total protein miktarı Lowry vd. [15] metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Total protein miktarı kontrol grubuna göre DMBA grubunda önemli düzeyde artış gösterdiği halde, PEG ve susam yağı verilen gruplarda azaldığı saptandı ($p<0,01$). Rutin verilen grupta total protein düzeyindeki azalmanın daha fazla olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Buna rağmen DMBA+PEG+Rutin 25 grubundaki azalma trendinin kısmi düzeyde olduğu tespit edildi ($p<0,05$). DMSO ile DMBA+PEG+Rutin 50 grubunda ise istatistikî farklılık gözlenmedi ($p>0,05$)

MDA, GSH ve GSSG analizleri HPLC cihazı PDA dedektörü ile yapıldı. MDA düzeyi kontrol grubuna göre DMBA grubunda kısmen yüksek bulundu ($p<0,05$). Ancak Rutin ve PEG grubunda belirgin düzeyde azaldığı ($p<0,001$), DMBA+PEG+Rutin 50 grubunda ise kısmen azaldığı ($p<0,05$) saptandı. Susam yağı, DMSO ve DMBA+PEG+Rutin 25 gruplarında ise MDA miktarının farklı oranlarda yüksek olduğu gözlemlendi (Sırasıyla, $p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,01$) (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Gelişme ortamına Rutin flavonoidi eklenen grupların total protein, MDA, GSH ve GSSG miktarlarının değişimi

Gruplar	Total protein (mg/g hücre peleti)	MDA (nmol g hücre peleti)	GSH (µg/g hücre peleti)	GSSG (µg/g hücre peleti)
Kontrol	2,90 ±0,05	208,43±17,13	355,45±11,11	47,85 ±1,17
DMBA	3,40 ±0,24 ^c	249,24 ±9,74 ^b	391,68 ±13,41 ^b	75,34 ±0,51 ^c
Rutin	1,69 ±0,09 ^d	125,71±6,97 ^d	255,70 ±13,45 ^d	37,16±0,88 ^c
PEG	2,40 ±0,19 ^c	149,22±9,49 ^d	248,03±9,97 ^d	35,28 ±1,59 ^c
Susam Yağı	2,25 ±0,09 ^c	229,83 ±11,79 ^b	397,59 ±22,84 ^b	48,27±1,83 ^a
DMSO	2,79±0,13 ^a	267,75 ±8,33 ^d	366,72 ±9,99 ^a	46,07±1,77 ^a
DMBA+PEG+Rutin 25	2,57±0,12 ^b	246,69 ±9,21 ^c	407,54±15,51 ^c	47,49 ±1,53 ^a
DMBA+PEG+Rutin 50	3,01± 0,27 ^a	186,07 ±9,72 ^b	305,92±23,74 ^c	45,66 ±0,99 ^a

GSH düzeyi kontrol grubuna göre DMBA ve Susam yağı verilen gruplarda kısmen artış gösterdiği gözlemlendi ($p<0,05$). Rutin ve PEG gruplarında ise belirgin düzeyde azalmıştır ($p<0,001$). DMSO grubunda kontrol grubuna göre istatistik farklılık bulunmadığı halde ($p>0,05$), DMBA+PEG+Rutin 25 grubunda önemli düzeyde artış gösterirken, DMBA+PEG+Rutin 50 grubunda ise aynı oranda azaldığı gözlemlendi ($p<0,01$) (Tablo 3.2). GSSG düzeyi kontrol grubuna göre DMBA, önemli düzeyde yükseliş gösterdiği halde Rutin ve PEG gruplarında azalış gösterdiği belirlendi ($p<0,01$). Diğer gruplarda ise istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 3.2).

3.1.2. Rutin Verilen Grupların Antioksidan Enzimlerin Sonuçları

Antioksidan enzimlerden Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSHpx) ve Glutasyon S Transferaz (GST) aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemler ile yapıldı (Tablo 3.3.). SOD düzeyi kontrol grubuna göre farklı oranlarda azaldığı tespit edildi. DMBA, Susam yağı ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında kısmen azalırken ($p<0,05$), PEG, DMSO ve DMBA+PEG+Rutin 25 daha fazla bir azalma tespit edildi ($p<0,01$). En fazla azalma trendi ise Rubin grubunda gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 3.3.). CAT aktivitesinin de SOD aktivitesinde olduğu gibi kontrol grubuna göre bütün gruplarda farklı oranlarda azaldığı belirlendi. CAT düzeyi DMBA, DMSO ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında kısmen ($p<0,05$), Rutin ve PEG gruplarında belirgin düzeyde ($p<0,001$), Susam yağı ve DMBA+PEG+Rutin 25 verilen gruplarda ise önemli düzeyde bir azalış olduğu belirlendi ($p<0,01$) (Tablo 3.3.).

GSHpx aktivitesi kontrol grubuna göre bütün gruplarda azaldığı belirlendi. DMBA ve Rutin grubunda önemli düzeyde ($p<0,01$), PEG, DMSO, Susam yağı, DMBA+PEG+Rutin 25 ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında çok yüksek oranda azalma gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 3.3). GST aktivitesinde de kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi. En fazla azalma trendi Rutin grubunda bulundu ($p<0,001$). DMBA, PEG, DMSO, Susam yağı, DMBA+PEG+Rutin 25 ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında ise rutin grubuna göre azalma trendi daha az düzeyde gözlemlendi ($p<0,01$) (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Gelişme ortamına Rutin flavonoidi eklenen grupların SOD, Katalaz, GSHpx ve GST enzim aktiviteleri

Gruplar	SOD(unit/g pelet)	CAT(unit/dk/g)	GSHpx(μ g/g pelet)	GST(unit/dk/g)
Kontrol	9,24 $\pm$ 0,22	2253,14 $\pm$ 98,69	61,32 $\pm$ 3,07	12,20 $\pm$ 0,29
DMBA	7,71 $\pm$ 0,49 ^b	1842,78 $\pm$ 88,69 ^b	34,38 $\pm$ 3,74 ^c	9,72 $\pm$ 0,32 ^c
Rutin	5,81 $\pm$ 0,17 ^d	1232,25 $\pm$ 54,91 ^d	24,48 $\pm$ 2,45 ^c	6,85 $\pm$ 0,14 ^d
PEG	6,11 $\pm$ 0,18 ^c	1155,13 $\pm$ 65,23 ^d	18,07 $\pm$ 0,91 ^d	7,18 $\pm$ 0,68 ^c
Susam Yağı	7,36 $\pm$ 0,17 ^b	1574,03 $\pm$ 65,69 ^c	16,33 $\pm$ 1,61 ^d	8,91 $\pm$ 0,22 ^c
DMSO	6,29 $\pm$ 0,01 ^c	1883,37 $\pm$ 99,53 ^b	9,75 $\pm$ 0,54 ^d	7,94 $\pm$ 0,28 ^c
DMBA+PEG+Rutin 25	6,05 $\pm$ 0,31 ^c	1615,79 $\pm$ 63,69 ^c	15,04 $\pm$ 1,19 ^d	7,76 $\pm$ 0,41 ^c
DMBA+PEG+Rutin 50	7,25 $\pm$ 0,27 ^b	1707,90 $\pm$ 66,36 ^b	18,54 $\pm$ 1,59 ^d	8,27 $\pm$ 0,77 ^c

3.1.3. Rutin verilen grupların Yağ asidi sonuçları

Tablo 3.4. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki doymuş asidi oranlarının değişimi (%)

Gruplar	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0
Kontrol	2,45 $\pm$ 0,19	1,16 $\pm$ 0,12	2,35 $\pm$ 0,08	37,30 $\pm$ 0,44	1,07 $\pm$ 0,05	16,97 $\pm$ 0,39
DMBA	1,12 $\pm$ 0,05 ^c	1,71 $\pm$ 0,11 ^b	1,25 $\pm$ 0,16 ^d	24,32 $\pm$ 0,76 ^d	0,47 $\pm$ 0,04 ^d	11,68 $\pm$ 0,52 ^c
Rutin	1,82 $\pm$ 0,18 ^b	0,60 $\pm$ 0,06 ^d	2,60 $\pm$ 0,31 ^b	43,23 $\pm$ 0,78 ^b	0,96 $\pm$ 0,06 ^a	23,01 $\pm$ 0,90 ^c
PEG	0,59 $\pm$ 0,06 ^d	1,42 $\pm$ 0,17 ^b	2,76 $\pm$ 0,30 ^b	48,12 $\pm$ 0,81 ^c	1,19 $\pm$ 0,08 ^a	26,99 $\pm$ 0,91 ^d
Susam Yağı	0,84 $\pm$ 0,11 ^d	2,60 $\pm$ 0,21 ^d	1,28 $\pm$ 0,20 ^d	23,49 $\pm$ 0,78 ^d	0,40 $\pm$ 0,08 ^d	11,94 $\pm$ 0,26 ^d
DMSO	1,72 $\pm$ 0,13 ^b	0,70 $\pm$ 0,11 ^c	3,28 $\pm$ 0,14 ^c	48,71 $\pm$ 0,51 ^c	1,02 $\pm$ 0,08 ^a	23,24 $\pm$ 0,12 ^b
DMBA+PEG+R 25	0,41 $\pm$ 0,04 ^d	1,67 $\pm$ 0,15 ^b	1,02 $\pm$ 0,02 ^d	23,20 $\pm$ 0,94 ^d	0,42 $\pm$ 0,08 ^d	13,31 $\pm$ 0,34 ^c
DMBA+PEG+R 50	0,33 $\pm$ 0,05 ^d	0,41 $\pm$ 0,06 ^d	1,23 $\pm$ 0,17 ^d	24,13 $\pm$ 1,08 ^d	0,50 $\pm$ 0,09 ^d	11,82 $\pm$ 0,38 ^d

Rutin verilen *S. cerevisiae* peletlerinin Gaz kromatografi ve FID dedektörü ile yapılan yağ asidi bileşimi içinde doymuş yağ asitlerinden, kaprik (10:0), laurik (12:0), Miristik (14:0), palmitik (16:0), heptadekanoik (17:0) ve stearik asit (18:0) bulunduğu belirlendi (Tablo 3.4). Doymuş yağ asidi bileşimi içinde palmitik ve stearik asitlerin oranı yüksekti, diğer yağ asitlerinin oranları % 5'den daha düşüktü. Bu yağ asitlerinin gruplar arasındaki değişimleri incelendiğinde laurik asit (10:0) kontrol grubuna göre bütün gruplarda farklı oranlarda azaldı ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). En fazla azalma PEG, Susam yağı, DMSO, DMBA+PEG+Rutin 25 ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında bulundu (Tablo 3.4).

Laurik asit kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı ve DMBA+PEG+Rutin 25 gruplarında yükseldiği gözlemlendi ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Diğer gruplarda ise azaldığı tespit edildi. Miristik asit kontrol grubuna göre Rutin, PEG ve DMSO gruplarında yüksek bulundu ($p < 0,05$, $p < 0,01$), diğer gruplarda ise azalma gözlemlendi ($p < 0,001$) (Tablo 3.4). Palmitik asit oranında kontrol grubuna göre DMBA, Susam Yağı, DMBA+PEG+Rutin 25 ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında belirgin düzeyde azalma ($p < 0,001$) ve Rutin, PEG ve DMSO gruplarında ise artışlar olduğu saptandı

($p<0,05$, $p<0,01$). Stearik asit oranında da Rutin, PEG ve DMSO gruplarında yükselme ($p<0,01$, $p<0,001$), DMBA, Susam Yağı, DMBA+PEG+Rutin 25 ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında ise azalma tespit edildi ($p<0,01$, $p<0,001$). Tablo 3.4). Heptadekanoik asit oranı kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+Rutin 25 ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında belirgin bir azalış gösterdiği halde ($p<0,001$), diğer gruplarda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 3.4).

Gaz Kromatografi analizi sonucunda yağ asidi bileşimi içinde tek çift bağlı yağ asitleri olarak pentadekanoik (15:1), palmitoleik (16:1 n-7), heptadekanoik (17:1), oleik (18:1, n-9c), (18:1, n-11) ve 18:1 n-9t gibi yağ asitlerinin mevcut olduğu saptandı. Pentadekanoik asit (15:1) miktarı kontrol grubuna göre PEG grubunda önemli seviye artış gösterdiği halde diğer gruplarda ($p<0,01$), diğer gruplarda farklı oranlarda azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0,001$). Palmitoleik asit düzeyi kontrol grubuna göre kısmen artış gösterdiği halde ($p<0,05$), PEG grubunda istatistik farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Diğer gruplarda ise farklı oranlarda azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Heptadekanoik asit (17:1), miktarı kontrol grubuna göre Rutin grubunda farklılık gözlenmediği halde ($p>0,05$), PEG grubunda kısmen yükselme belirlendi ($p<0,05$). Diğer gruplarda ise farklı oranlarda azaldığı tespit edildi ($p<0,01$, $p<0,001$) (Tablo 3.5) (Şekil 3.1-3.9). Oleik asit (18:1, n-9c) miktarı kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında çok belirgin düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). PEG ve DMSO gruplarında ise kısmen azaldığı belirlendi ($p<0,05$). 18:1 n-11 miktarı DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında oranının yükseldiği belirlendi ($p<0,001$). Rutin ve PEG gruplarında istatistik farklılık bulunmadı ($p>0,05$). DMSO grubunda ise kısmen artış tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 3.5) (Şekil 3.1-3.9). 18:1 n-9t miktarı PEG ve DMSO gruplarında farklı oranlarda artış olmasına rağmen ($p<0,05$; $p<0,01$), DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında azalmıştı ($p<0,001$), (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki tek çift bağlı doymamış asidi (MUFA) oranlarının değişimi (%)

Gruplar	C15:1	C16:1 n-7	C17:1	C18:1 n-9c	18:1 n-11	C18:1 n-9t
Kontrol	2,09±0,14	2,23±0,31	1,58±0,14	5,55±1,13	0,86±0,01	4,36±0,27
DMBA	0,83±0,09 ^d	1,39±0,12 ^c	0,82±0,08 ^c	20,55±1,38 ^d	3,31±0,27 ^d	2,27±0,25 ^d
Rutin	1,49 ±0,28 ^b	2,62±0,28 ^b	1,31±0,19 ^a	6,74±2,44 ^a	0,86±0,01 ^a	4,50±0,16 ^a
PEG	3,11±0,23 ^c	2,48±0,18 ^a	1,96±0,22 ^b	3,85±0,88 ^b	1,03±0,03 ^a	5,46±0,14 ^b
Susam Yağı	0,72±0,11 ^d	1,39±0,29 ^c	0,54±0,13 ^d	24,45±2,29 ^d	3,46±0,27 ^d	2,27±0,45 ^d
DMSO	1,81 ±0,21 ^b	1,72±0,36 ^b	0,67±0,15 ^d	3,12±0,22 ^b	1,24±0,03 ^b	6,15±0,62 ^c
DMBA+PEG+R 25	0,63 ±0,08 ^d	0,97±0,11 ^d	0,41±0,11 ^d	25,86±2,11 ^d	5,41±0,28 ^d	2,29±0,19 ^d
DMBA+PEG+R 50	0,88 ±0,09 ^d	1,70±0,20 ^b	0,53±0,16 ^d	28,65±2,46 ^d	3,51±0,21 ^d	2,11±0,46 ^d

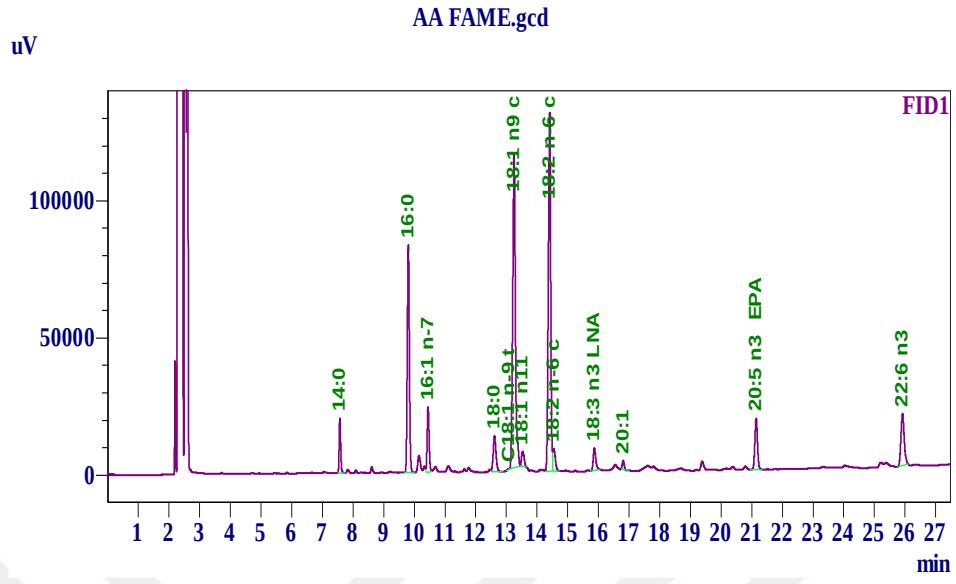
Çok doymamış yağ asitleri içinde linoleik (18:2 n-6) ve linolenik (18:3, n-3) yağ asitleri bulundu (Tablo 3.6) (Şekil 3.2- Şekil 3.9). Linoleik asit miktarı kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında belirgin düzeyde yüksek bulundu

($p<0,001$). Ancak Rutin, PEG ve DMSO gruplarında belirgin düzeyde azalmıştı ($p<0,001$). Linoleik asit (18:3 n-6) miktarı ise kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında belirgin düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0,001$). Rutin, PEG ve DMSO gruplarında ise kısmen artış tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 3. 6) (Şekil 3.1-Şekil 3.9).

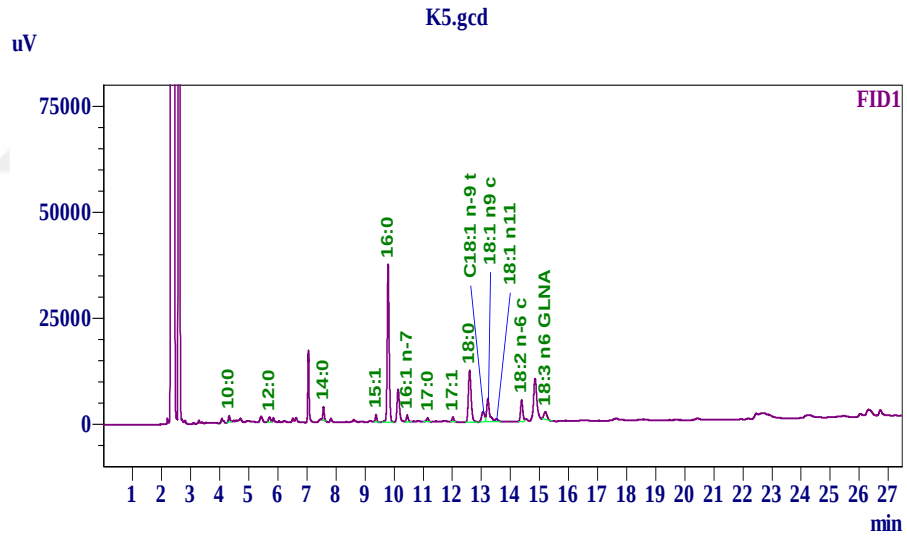
Tablo 3.6. Gelişme ortamına Rutin flavonoidi eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki çok çift bağılı doymamış asidi (PUFA) ile toplam yağ asidi oranlarının değişimi (%)

Gruplar	C18:2 n-6	C18:3	Σ Doymuş	Σ Doymamış	ΣMUFA	ΣPUFA
Kontrol	18,61±1,61	3,59±0,08	61,30	38,87	16,67	22,21
DMBA	26,22±1,51 ^d	1,58±0,13 ^d	40,55 ^d	59,45 ^d	31,70 ^c	27,75 ^c
Rutin	5,61±0,35 ^d	4,29±0,19 ^b	72,22 ^d	25,62 ^d	17,52 ^a	8,11 ^d
PEG	3,91±0,17 ^d	4,31±0,20 ^b	81,27 ^d	18,89 ^d	11,67 ^c	7,22 ^d
Susam Yağı	21,49±1,81 ^d	1,33±0,11 ^d	40,55 ^d	60,50 ^d	33,99 ^d	26,51 ^c
DMSO	2,28±0,11 ^d	4,34±0,11 ^b	78,29 ^d	21,33 ^d	14,73 ^b	6,62 ^d
DMBA+PEG+C 25	23,30±1,12 ^d	1,38±0,16 ^d	40,00 ^d	60,00 ^d	35,80 ^d	24,42 ^b
DMBA+PEG+C 50	23,0,7±1,43 ^d	1,13±0,05 ^d	38,42 ^d	61,93 ^d	37,73 ^d	24,20 ^b

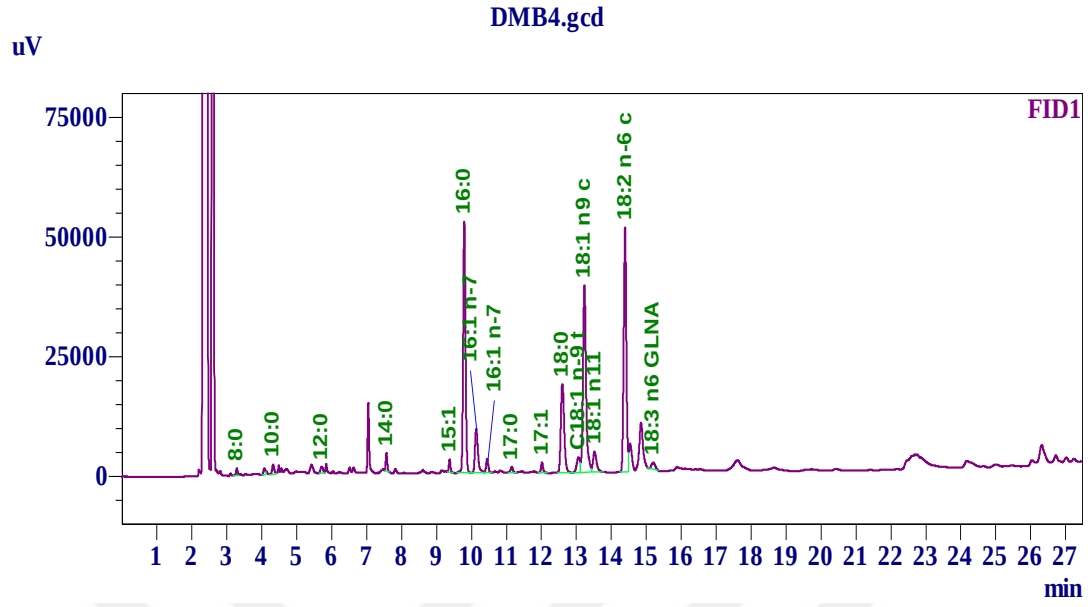
Toplam doymuş yağ asidi miktarı kontrol grubuna göre Rutin, PEG ve DMSO gruplarında yüksek bulundu ($p<0,001$). DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında ise düşük bulundu ($p<0,001$). Toplam doymamış yağ asidi miktarında ise kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında artış gözlenirken, diğer gruplarda azaldığı belirlendi ($p<0,001$). Toplam MUFA ı miktarı kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında yüksekti ($P<0,01$, $p<0,001$). Rutin grubunda istatistik farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DMSO ve PEG gruplarında farklı oranlarda azaldı ($p<0,05$; $p<0,01$) (Tablo 3.6). Toplam PUFA miktarı Rutin, PEG ve DMSO gruplarında düşük bulundu ($p<0,001$), DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında ise farklı oranlarda azaldığı belirlendi ($p<0,05$, $p<0,01$) (Tablo 3.6).



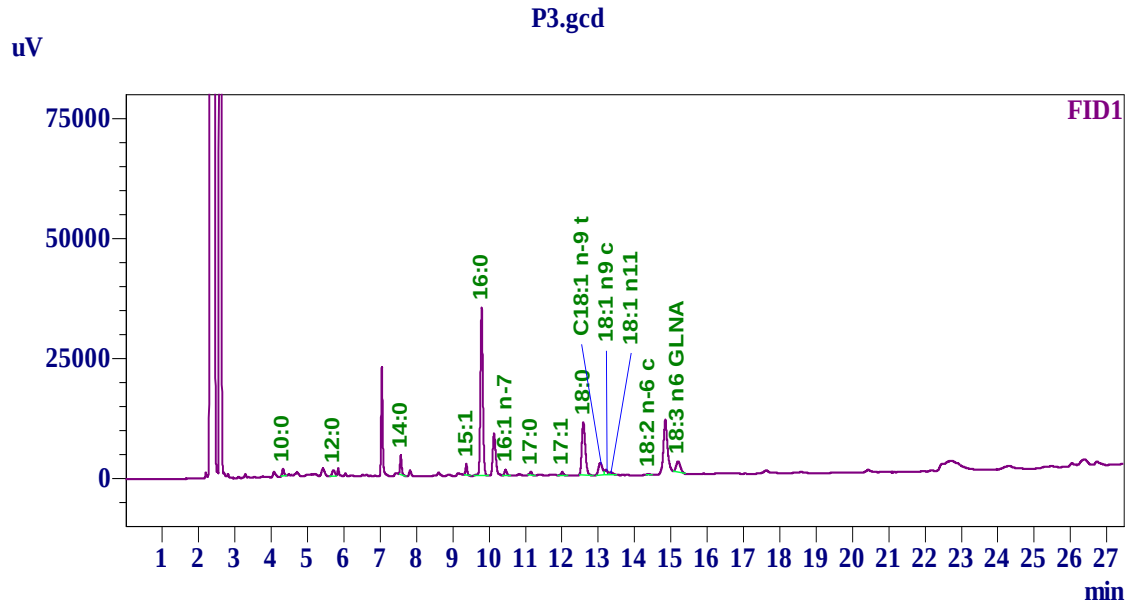
Şekil 3.1. Standart yağ asidi kromatogramı (GC-FID dedektörü ile alınan standart yağ asidi kromatogramı)



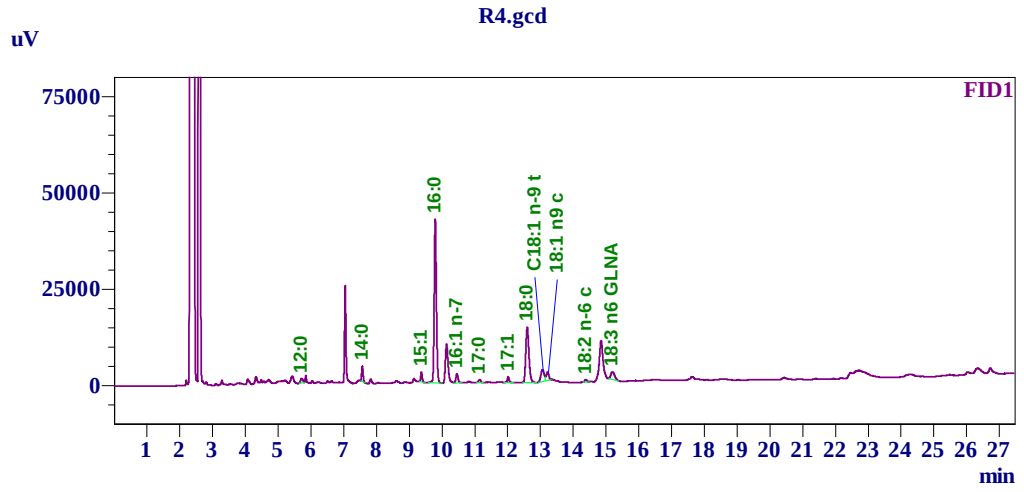
Şekil 3.2. *S. cerevisiae*'nin kontrol grubu peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



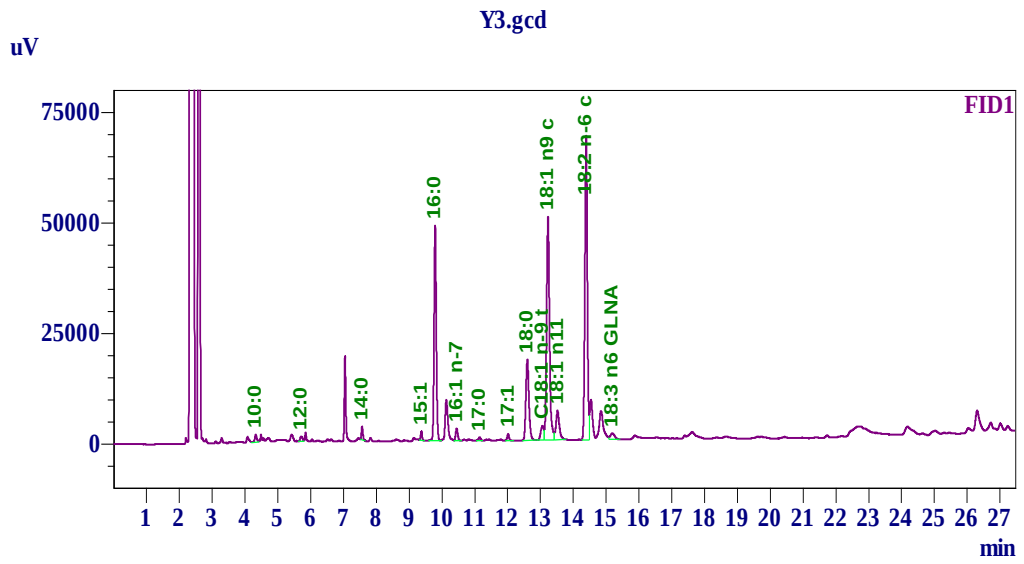
Şekil 3.3. DMBA eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



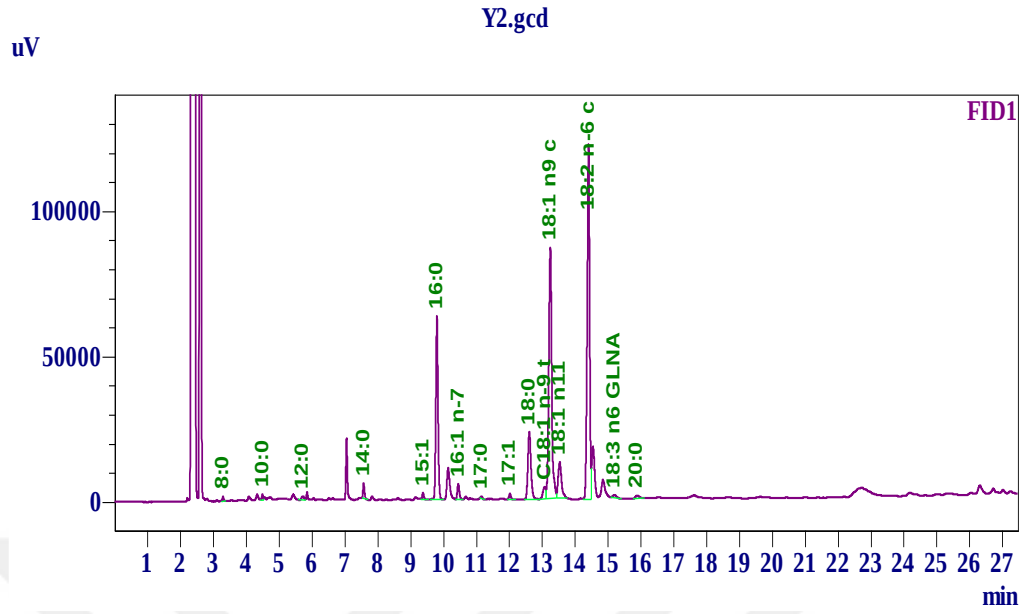
Şekil 3.4. PEG eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



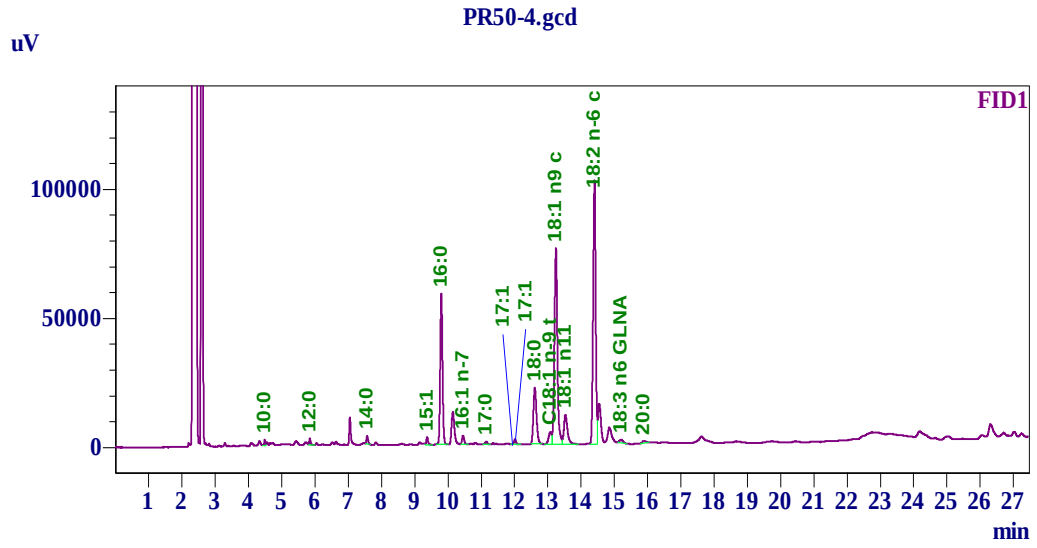
Şekil 3.5. Rutin eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



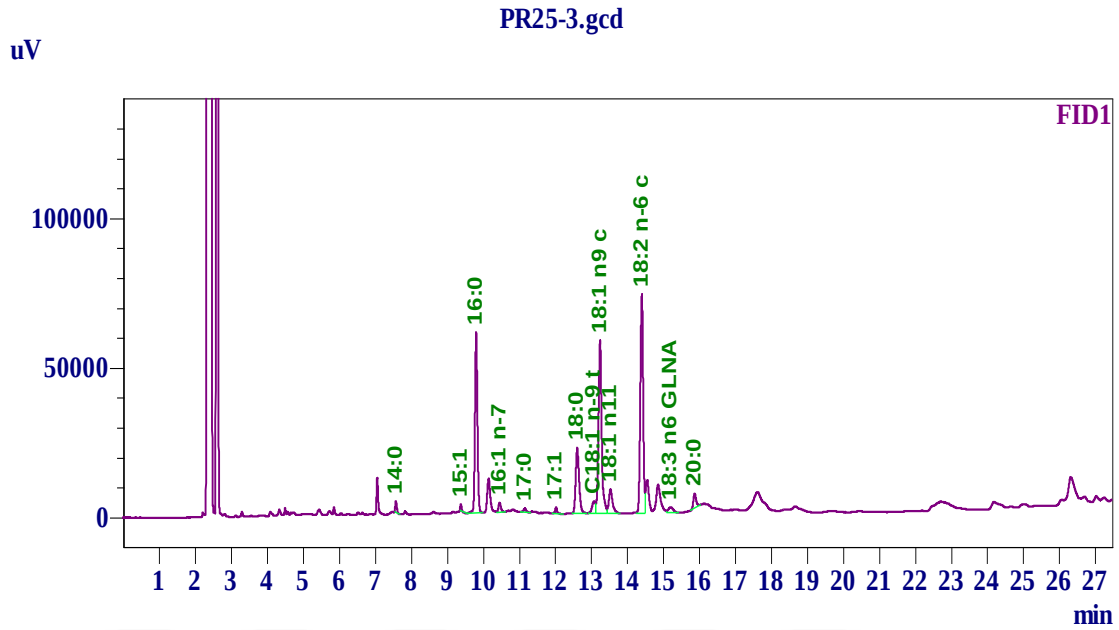
Şekil 3.6. Susam yağı eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



Şekil 3.7. Susam yağı eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



Şekil 3.8. DMBA+PEG+Rutin 50 eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı



Şekil 3.9. DMBA+PEG+Rutin 25 eklenen *S. cerevisiae* peletlerinden GC-FID ile analiz edilen yağ asidi kromatogramı

3.1.4. Rutin verilen grupların lipofilik moleküllerin sonuçları

S. cerevisiae peletlerinden izole edilen K2, δ -Tokoferol, D3, α -Tokoferol, K1 gibi lipofilik vitaminler ile Ergosterol, stigmasterol ve β -Sitosterol gibi fitosterollerin miktarları HPLC-PDA dedektöründe 205 nm’de ölçüldü. Sonuçlara bakıldığında kontrol grubuna göre K2 vitamin düzeyi DMBA, Susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 gruplarında yüksek bulundu ($p<0,001$; $p<0,05$). Buna karşılık Rutin, DMSO ve PEG gruplarında azaldığı gözlemlendi ($p<0,01$). δ -Tokoferol düzeyi kontrol grubuna göre belirgin düzeyde azaldığı halde, diğer gruplarda farklı oranlarda yükseldiği belirlendi ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). D3 vitamin düzeyinde kontrol grubuna göre Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında istatistik farklılık bulunmadı ($p>0,05$), ancak Rutin, PEG ve DMSO gruplarında azaldı ($p<0,001$ ve $p<0,05$). DMBA grubunda ise kısmen yükseldiği saptandı ($p<0,05$) (Tablo 3.7). α -Tokoferol miktarı kontrol grubuna göre DMBA, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında belirgin düzeyde ($p<0,001$), Rutin ve Susam yağı gruplarında kısmen yükseldiği belirlendi ($p<0,05$). DMSO grubunda farklılık bulunmadı ($p>0,05$). K1 vitamin düzeyi kontrol grubuna göre DMBA grubunda belirgin düzeyde yükseldiği halde ($p<0,001$), Rutin ve PEG gruplarında önemli düzeyde azaldı ($p<0,01$). Diğer gruplarda ise istatistik farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların ADEK vitaminlerinin miktarları (ug/g hücre peleti)

Gruplar	K2	δ Tokoferol	D3	α-Tokoferol	K1
Kontrol	0,99±0,04	8,57±0,23	2,11±0,16	1,03±0,02	0,98 ±0,02
DMBA	1,68±0,08 ^d	21,81±1,11 ^d	2,49 ±0,21 ^b	2,38 ±0,14 ^d	1,74±0,16 ^d
Rutin	0,52 ±0,02 ^c	11,99±0,98 ^b	0,76±0,02 ^d	1,34 ±0,08 ^b	0,30 ±0,01 ^c
PEG	0,51±0,03 ^c	25,07±1,54 ^d	0,85±0,03 ^d	0,76 ±0,03 ^b	0,47±0,02 ^c
Susam yağı	1,57±0,09 ^d	3,07±0,12 ^d	2,04±0,28 ^a	1,29±0,09 ^b	0,83±0,08 ^a
DMSO	0,53±0,04 ^c	19,33±1,14 ^d	1,06±0,06 ^c	1,08 ±0,08 ^a	0,89 ±0,03 ^a
DMBA+PEG+C 25	1,24±0,07 ^b	14,97±1,01 ^c	2,13±0,46 ^a	2,65 ±0,21 ^d	0,83±0,0*098 ^a
DMBA+PEG+C 50	0,97±0,05 ^a	22,99±1,45 ^d	2,09±0,36 ^a	2,40 ±0,018 ^d	0,87± 0,09 ^a

Tablo 3.8. Gelişme ortamına Rutin eklenen grupların sterol miktarları (µg/g hücre peleti)

Gruplar	Ergosterol	Stigmasterol	β-Sitosterol
Kontrol	516,39± 21,02	15,03±0,33	9,73± 0,21
DMBA	608,74 ±25,78 ^c	98,26±3,65 ^d	24,76± 0,91 ^d
Rutin	357,91±11,12 ^d	13,09±0,67 ^a	10,69±0,16 ^a
PEG	305,53±10,99 ^d	9,45±0,56 ^b	9,37± 0,38 ^a
Susam Yağı	385,42 ±13,56 ^d	92,57±2,87 ^d	20,19 ±0,82 ^d
DMSO	499,51±18,76 ^a	11,41±0,78 ^b	7,62±0,56 ^b
DMBA+PEG+C 25	326,73±14,67 ^d	80,19±1,89 ^d	17,82±0,68 ^c
DMBA+PEG+C 50	393,65 ±13,33 ^d	90,32±2,67 ^d	25,95± 0,82 ^d

Ergosterol miktarı kontrol grubuna göre DMBA grubunda önemli düzeyde artmasına rağmen ($p<0,01$), DMSO grubunda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Diğer gruplarda ise belirgin düzeyde azaldığı saptandı ($p<0,001$). Stigmasterol ve β-Sitosterol miktarları kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında farklı oranlarda yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,01$, $p<0,001$). Rutin ve PEG grubunda farklılık bulunmadı ($p>0,05$). DMSO grubunda ise kısmen azaldığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 3.8).

3.2. Krizin Verilen Grupların Sonuçları

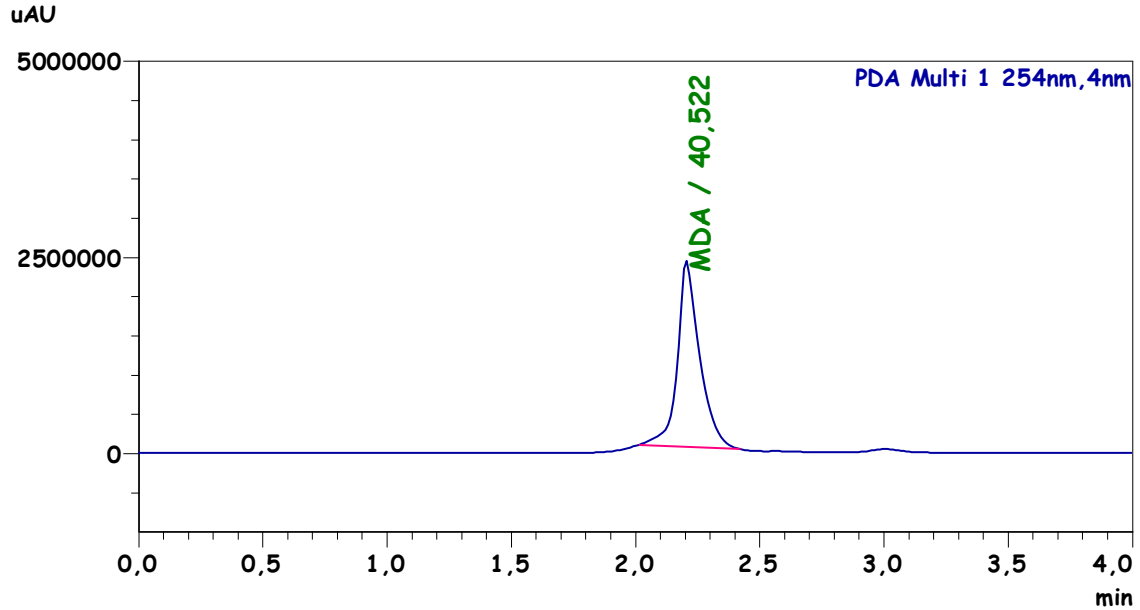
S. cerevisiae'nin gelişme ortamına krizin eklendi ve rutin eklenen grupta olduğu gibi 72 saat sonra 600 nm'de hücre yoğunlukları ölçüldü (Tablo 3.9). Hücre yoğunlukları arasında küçük farklılıklar olmasına rağmen istatistik açıdan farklılık gözlenmedi. Yaş pelet miktarı açısından bakıldığında ise kontrol grubu ile DMBA grubu arasında farklılık gözlenmedi ($p>0,05$), ancak diğer gruplarda pelet miktarında kısmen bir yükselme olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların spektrofotometrede ölçülen hücre yoğunluğu ve hücre pelet miktarı

Gruplar	ABS (600 nm)	Pelet miktarı (g)
Kontrol	2,42± 0,01	3,64±0,13
DMBA	2,33±0,02 ^a	3,74 ±0,07 ^a
Krizin	2,34±0,02 ^a	4,03 ±0,05 ^b
PEG	2,34 ±0,03 ^a	4,23 ±0,11 ^b
Susam Yağı	2,34 ±0,01 ^a	4,01±0,14 ^b
DMSO	2,38±0,02 ^a	4,08 ±0,07 ^b
DMBA+PEG+C 25	2,38 ±0,02 ^a	4,15±0,09 ^b
DMBA+PEG+C 50	2,38±0,01 ^a	4,05± 0,05 ^b

3.2.1. Krizin Grubunun Total Protein, MDA, GSH, GSSG Sonuçları

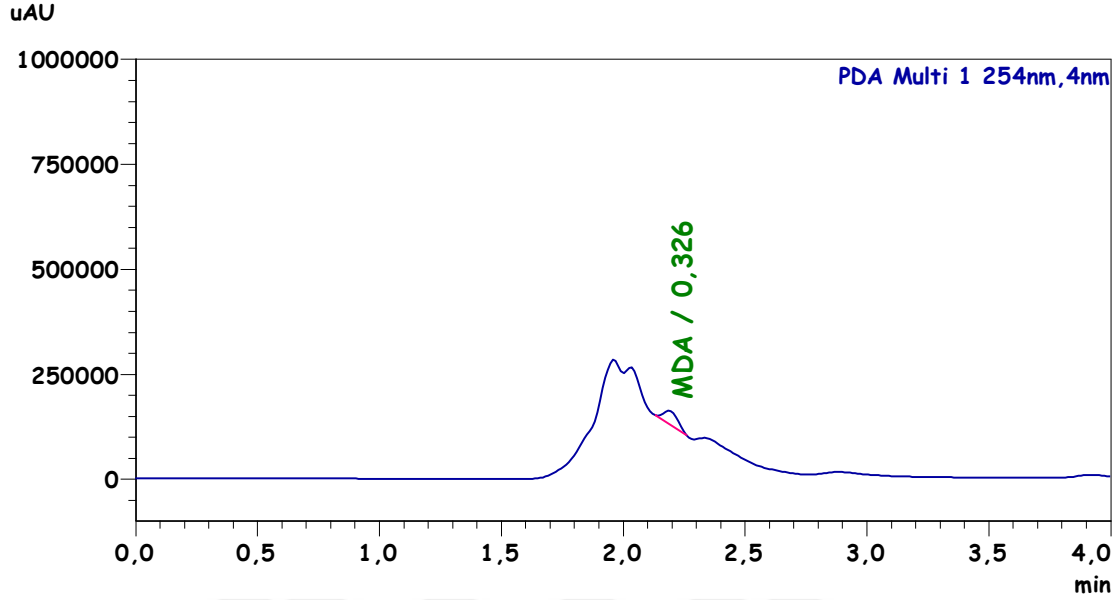
Total protein miktarı kontrol grubuna göre DMBA, DMSO ve Krizin gruplarında kısmen azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Diğer gruplarda ise yükseldiği gözlemlendi ($p<0,01$, $p<0,001$). MDA miktarı kontrol grubuna göre DMBA DMBA+PEG+C 50 ve PEG gruplarında kısmen artış gösterdiği halde ($p<0,05$), Susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 verilen gruplarda ise belirgin düzeyde yükselme gözlemlendi ($p<0,001$). Krizin grubu ile DMSO gruplarında kontrol grubuna göre istatistik farklılık bulunmadı ($p>0,05$).



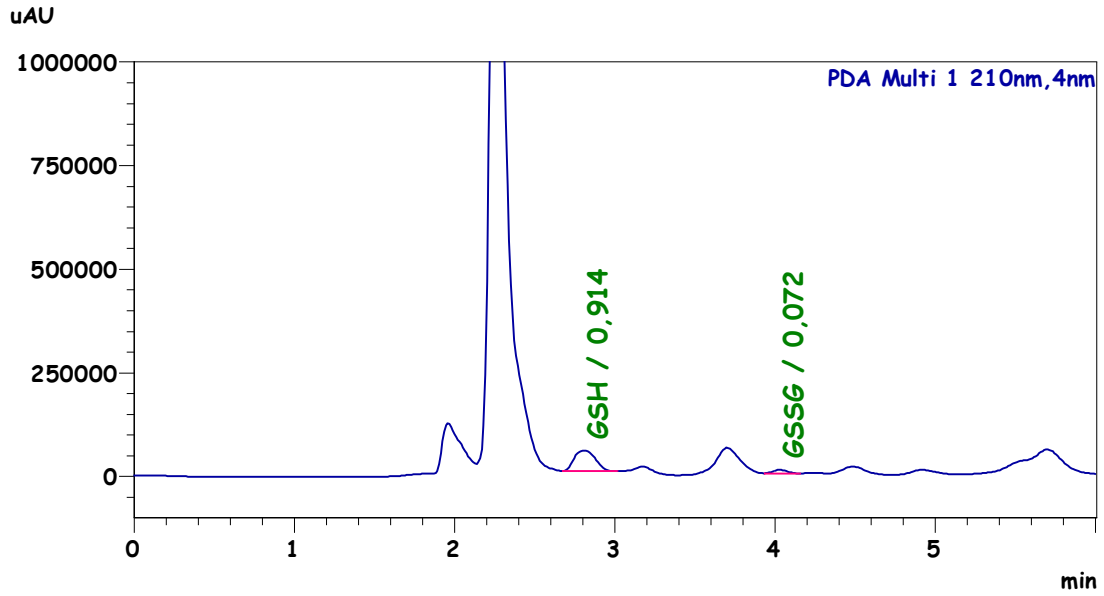
Şekil 3.10. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan MDA'nın standart kromatogramı

Krizin ile yapılan MDA çalışma kromatogramları şekil 3.10 ve şekil 3.11'de gösterilmiştir. GSH miktarı kontrol grubuna göre DMBA ve Krizin gruplarında kısmen yükseldiği ($p<0,05$), PEG, Susam yağı DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında ise çok daha yüksek oranda artış olduğu belirlendi ($p<0,01$, $p<0,001$). DMSO verilen gruba ise istatistik farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). GSSG miktarının kontrol grubuna göre bütün gruplarda farklı oranlarda yükseldiği

saptandı ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). En fazla yükselme PEG, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında olduğu belirlendi ($p<0,001$) (Tablo 3.10). Krizin ile yapılan GSH ve GSSG kromatogramı şekil 3.12’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan MDA'nın kontrol grubuna ait kromatogramı



Şekil 3.12. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan GSH ve GSSG'nin DMBA grubuna ait kromatogramı

Tablo 3.10. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların total protein, MDA, GSH ve GSSG miktarlarının değişimi

Gruplar	Total protein (mg/g hücre peleti)	MDA (nmol g hücre peleti)	GSH (µg/g hücre peleti)	GSSG (µg/g hücre peleti)
Kontrol	1,93± 0,17	60,55±2,43	174,46±9,81	10,99±0,71
DMBA	1,58±0,22 ^b	102,24 ±2,25 ^b	194,16±12,87 ^b	22,6±0,73 ^c
Krizin	1,68 ±0,09 ^b	65,18 ±2,71 ^a	221,99±11,01 ^b	26,49± 0,88 ^c
PEG	2,71±0,21 ^c	115,68 ±6,81 ^b	356,65±13,61 ^c	52,81 ±2,74 ^d
Susam yağı	3,42± 0,26 ^d	258,06±12,52 ^d	705,92±10,94 ^d	48,53±1,16 ^d
DMSO	1,68±0,27 ^b	66,69±6,16 ^a	169,59±6,58 ^a	15,95 ±0,92 ^b
DMBA+PEG+C 25	2,96 ±0,21 ^c	220,72±11,12 ^d	500,37±16,75 ^d	40,06±2,51 ^d
DMBA+PEG+C 50	2,35 ±0,24 ^c	119,64 ±10,33 ^b	365,79 ±17,09 ^c	45,92±2,01 ^d

3.2.2. Krizin (Chrysin) grubunun Antioksidan Enzim sonuçları

SOD aktivitesi kontrol grubuna göre krizin grubunda istatistik farklılık bulunmadığı halde ($p>0,05$), diğer grupların hepsinde azalmıştı ($p<0,05$). CAT aktivitesi kontrol grubuna göre bütün gruplarda farklı oranlarda azaldı ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). En fazla azalma PEG grubunda gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 3.11).

Tablo 3.11. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların SOD ve Katalaz enzim aktiviteleri

Gruplar	SOD(unit/g pelet)	CAT(unit/dk/g)
Kontrol	2,27± 0,06	1782,51±38,26
DMBA	2,51±0,04 ^b	1371,15±39,43 ^c
Krizin	2,19±0,03 ^a	1387,79±36,14 ^c
PEG	2,05±0,04 ^b	964,92±32,15 ^d
Susam Yağı	2,08 ±0,08 ^b	1557,04± 37,72 ^b
DMSO	1,98± 0,02 ^b	1356,52±18,41 ^c
DMBA+PEG+C 25	1,90± 0,04 ^b	1305,19 ±38,73 ^c
DMBA+PEG+C 50	2,07±0,03 ^b	1322,57 ±28,73 ^c

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi kontrol grubuna göre Susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 gruplarında belirgin düzeyde arttığı halde ($p<0,001$), DMBA, Krisin ve PEG gruplarında azaldı ($p<0,05$, $p<0,01$). Glutasyon peroksidaz aktivitesi (GSHpx) kontrol grubu ile DMBA arasında istatistiksel farklılık göstermedi ($p>0,05$). Krisin, PEG, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında kısmen yükseldiği gözlemlendi ($p<0,05$). DMSO grubunda ise azaldığı belirlendi ($p<0,01$).

Glutasyon S transferaz aktivitesi (GST), DMBA ile kontrol grubu arasında istatistiksel farklılık bulunmadığı halde ($p>0,05$), diğer bütün gruplarda kısmen azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 3.12).

Tablo 3.12. Gelişme ortamına krizin eklenen grupların Glutatyon Redüktaz (GR) GSHpx ve GST enzim aktiviteleri

Gruplar	GR (µg prot/dk/g)	GSHpx(unit/dk/g)	GST(unit/dk/g)
Kontrol	5,65± 0,41	28,77±1,16	2,78±0,09
DMBA	4,89± 0,42 ^b	27,49 ±0,62 ^a	2,69±0,05 ^a
Krizin	4,70 ±0,33 ^b	32,34±0,77 ^b	2,48±0,04 ^b
PEG	4,16±0,44 ^c	31,89±0,67 ^b	2,39±0,06 ^b
Susam Yağı	9,71±0,34 ^d	35,02±1,27 ^c	2,53±0,08 ^b
DMSO	4,52±0,28 ^b	21,41±1,81 ^c	2,43±0,04 ^b
DMBA+PEG+C 25	8,04±0,98 ^d	33,64±0,71 ^b	2,43±0,05 ^b
DMBA+PEG+C 50	5,51±0,32 ^a	31,36±0,74 ^b	2,49±0,03 ^b

3.2.3. Krizin verilen grupların yağ asidi sonuçları

Rutin grubunda olduğu gibi krizin verilen grupların doymuş yağ asidi bileşimi içinde kaprik (10:0), laurik (12:0), miristik (14:0), palmitik (16:0), heptadekanoik (17:0) ve stearik (18:0) asitlerin bulunduğu gözlemlendi (Tablo 3.13). 10:0 düzeyi Susam yağı, DMSO, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında kısmen artış göstermesine rağmen ($p<0,05$), diğer gruplarda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). 12:0 düzeyi kontrol grubuna göre krizin PEG ve Susam yağı eklenen gruplarda kısmen yükselmesine rağmen ($p<0,05$), diğer gruplarda farklılık bulunmadı ($p<0,05$). 14:0 miktarı DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında farklı oranlarda azalmasına rağmen ($p<0,05$, $p<0,001$), Krizin ve DMSO gruplarında yüksek bulundu ($p<0,05$, $p<0,001$). 16:0 oranı kontrol grubuna göre Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında farklı oranlarda azalmıştı ($p<0,05$, $p<0,01$). Krizin ve PEG gruplarında yüksek bulundu ($p<0,01$). 17:0 miktarı DMBA grubunda kısmen azalmıştı ($p<0,05$). Diğer gruplarda ise farklı oranlarda yükseldiği gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0,001$). 18:0 miktarı susam yağı ve PEG verilen gruplarda istatistiksel farklılık göstermediği halde, DMBA, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında ise azaldığı belirlendi ($p<0,05$, $p<0,001$). Krizin ile DMSO verilen gruplarda yükselme gözlemlendi $8p<0,01$, $p<0,05$) (Tablo 3.13).

Tablo 3.13. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki doymuş asidi oranlarının değişimi (%)

Gruplar	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0
Kontrol	0,04±0,01	0,36±0,09	3,15±0,16	29,53±0,27	0,76± 0,08	10,98± 0,27
DMBA	0,04±0,01 ^a	0,28±0,08 ^a	1,93± 0,11 ^d	23,10 ±1,08 ^c	0,57±0,06 ^b	8,75±0,53 ^b
Krizin	0,06±0,02 ^a	0,51±0,09 ^b	3,65±0,21 ^b	37,43 ±0,72 ^c	1,10± 0,09 ^b	15,62± 0,43 ^c
PEG	0,06± 0,02 ^a	0,72±0,09 ^b	3,23±0,18 ^a	35,82 ±0,47 ^c	2,10± 0,13 ^d	12,26 ±0,24 ^a
Susam Yağı	0,10±0,03 ^b	0,53±0,07 ^b	2,45 ±0,13 ^d	27,61 ±0,37 ^b	1,54±0,09 ^c	10,29±0,36 ^a
DMSO	0,07 ±0,01 ^b	0,38±0,06 ^a	4,09 ±0,24 ^c	37,07 ±1,05 ^c	1,19 ±0,08 ^b	13,98±0,46 ^b
DMBA+PEG+C 25	0,11 ±0,04 ^b	0,41 ±0,05 ^a	1,68 ±0,11 ^d	21,25±0,66 ^c	0,98 ±0,07 ^b	7,61 ±0,26 ^d
DMBA+PEG+C 50	0,09 ±0,03 ^b	0,39 ±0,04 ^a	1,63±0,09 ^d	22,45 ±0,35 ^c	1,03±0,06 ^b	8,12 ±0,27 ^d

Tek çift bağılı yağ asitleri içinde 15:1, 16:1 n-7, 17:1, 18:1, n-9c, 18:1 n11 ve 18:1 n-9t yağ asitlerinin varlığı saptandı. Bu yağ asitleri içinde 15:1 miktarı kontrol grubuna göre DMBA, susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında azaldığı belirlendi ($p<0,05$, $p<0,01$). PEG grubunda ise kısmen yüksek bulundu ($p<0,05$). 16:1, n-7 miktarı DMBA, susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında azalmıştı ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$), krizin verilen grupta kısmen artış ($p<0,05$) ve DMSO grubunda ise farklılık bulunmadı ($p>0,05$). 17:1 düzeyi kontrol grubuna göre DMBA grubunda farklılık bulunmadığı halde, diğer grupların bütününde farklı oranlarda yükselme gösterdi ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). En fazla artış PEG, susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 gruplarında yükseldiği belirlendi ($p<0,001$, $p<0,01$) (Tablo 3.14).

18:1, n-9c düzeyinin kontrol grubuna göre Krizin, PEG, Susam yağı ve DMSO gruplarında belirgin düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0,01$, $p<0,001$). DMBA, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında ise artışlar gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0,01$). 18:1 n-11 düzeyi, 18:1 n-9c tersine kontrol grubuna göre DMBA grubunda azalırken ($p<0,05$), diğer gruplarda farklı oranlarda artışlar saptandı ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). 18:1 n-9t düzeyi krizin ve DMSO gruplarında kısmen artmasına rağmen ($p<0,05$) diğer gruplarda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 3.14).

Tablo 3.14. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki tek çift bağılı doymamış asidi (MUFA) oranlarının değişimi (%)

Gruplar	15:1	16:1 n-7	17:1	18:1 n-9c	18:1 n-11	18:1 n-9t
Kontrol	0,61±0,01	2,87±0,15	0,41±0,05	18,61±1,37	4,50±0,56	0,39±0,02
DMBA	0,44 ±0,02 ^b	2,46±0,14 ^b	0,50 ±0,06 ^a	23,29±1,12 ^b	3,99 ±0,45 ^b	0,33±0,01 ^a
Krizin	0,73±0,04 ^a	3,59±0,11 ^b	0,70 ±0,08 ^b	8,88 ±0,89 ^d	5,37±0,65 ^b	0,75±0,09 ^b
PEG	0,83±0,08 ^b	2,32 ±0,09 ^b	1,95±0,16 ^d	5,36±0,74 ^d	15,14±118 ^d	0,41±0,04 ^a
Susam Yağı	0,36 ±0,02 ^c	1,67 ±0,08 ^c	1,58±0,12 ^d	12,95±1,11 ^c	12,36±0,98 ^d	0,33±0,02 ^a
DMSO	0,52 ±0,03 ^a	2,98 ±0,11 ^a	0,64±0,09 ^b	8,74 ±1,09 ^d	6,28 ±0,72 ^c	0,61±0,05 ^b
DMBA+PEG+C 25	0,32±0,04 ^c	1,27±0,07 ^d	1,06±0,11 ^c	27,97±1,56 ^c	11,04±0,89 ^d	0,38±0,01 ^a
DMBA+PEG+C 50	0,44 ±0,04 ^b	1,23±0,08 ^d	0,99±0,09 ^c	22,84±1,13 ^b	7,67±0,54 ^c	0,49±0,02 ^a

18:2 n-6 miktarı kontrol grubuna göre DMBA ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında önemli bir artış göstermesine rağmen ($p<0,01$), susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 gruplarında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Diğer gruplarda ise farklı oranlarda azaldı ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). 18:3 miktarı kontrol grubuna göre DMBA grubunda bariz bir istatistiksel farklılık bulunmadı, buna karşılık diğer gruplarda bariz artışlar gösterdi ($p<0,01$, $p<0,001$). En fazla artışların olduğu gruplar Krizin, PEG ve Susma yağı gruplarıydı ($p<0,001$). Toplam doymuş yağ asidi miktarı DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında düşük bulundu ($p<0,05$, $p<0,001$). Krizin, PEG ve DMSO gruplarında Σ Doymuş yağ asidi miktarı yüksekti ($p<0,001$). Σ Doymamış yağ asidi miktarında ise aynı gruplarda Σ Doymuş yağ asidi düzeyinin tersi gözlemlendi (Tablo 3.15). Σ MUFA oranı DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında yüksek bulundu ($p<0,05$, $p<0,001$). Krizin ve DMSO gruplarında ise azalmıştı ($p<0,05$,

$p<0,001$). Σ PUFA oranı kontrol grubuna göre DMBA ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında yüksek bulundu ($p<0,01$), Krizin, PEG ve DMSO gruplarında ise azalmıştı ($p<0,01$, $p<0,001$). Susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 gruplarında ise farklılık bulunmadı (Tablo 3.15).

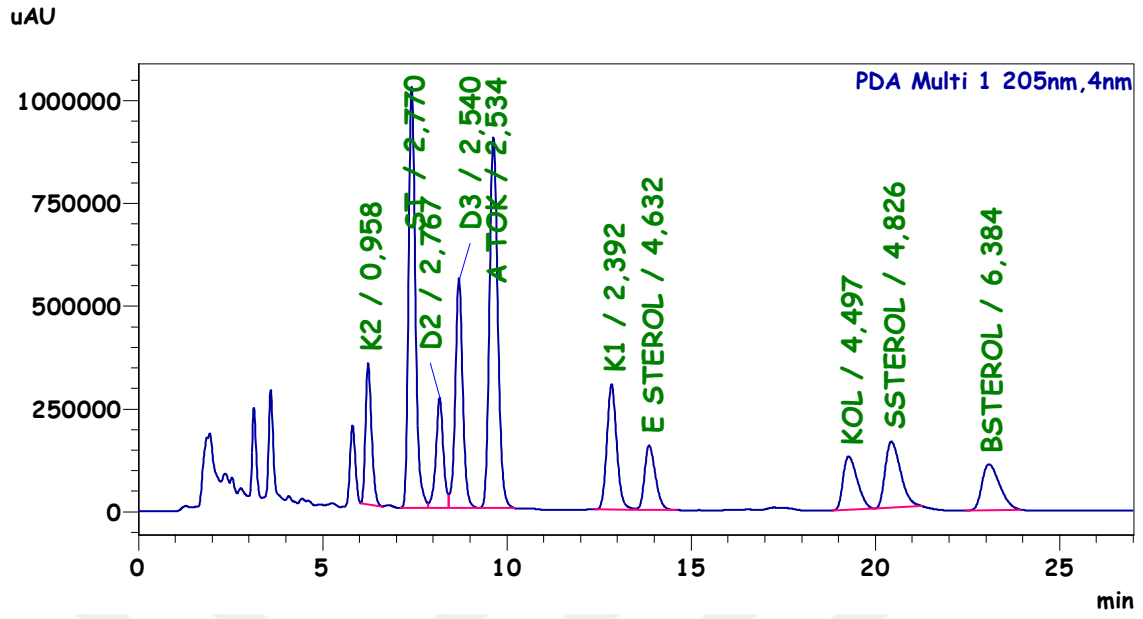
Tablo 3.15. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların yağ asidi bileşimi içindeki çok çift bağlı doymamış asidi (PUFA) ile toplam yağ asidi oranlarının değişimi (%)

Gruplar	C18:2 n-6	C18:3	Σ Doymuş	Σ Doymamış	Σ MUFA	Σ PUFA
Kontrol	27,47 $\pm$ 1,13	0,32 $\pm$ 0,01	44,82	55,37	27,58	27,79
DMBA	33,93 $\pm$ 0,69 ^c	0,39 $\pm$ 0,02 ^a	34,67 ^d	65,33 ^d	31,01 ^b	34,32 ^c
Krizin	20,34 $\pm$ 0,96 ^c	1,37 $\pm$ 0,11 ^d	58,27 ^d	41,73 ^d	20,02 ^c	21,71 ^c
PEG	18,58 $\pm$ 0,78 ^d	1,16 $\pm$ 0,09 ^d	54,19 ^d	44,52 ^d	26,01 ^b	18,81 ^d
Susam Yağı	26,45 $\pm$ 1,09 ^a	1,78 $\pm$ 0,08 ^d	42,52 ^b	57,45 ^b	29,25 ^b	28,23 ^a
DMSO	22,01 $\pm$ 0,98 ^b	0,66 $\pm$ 0,06 ^c	56,78 ^d	43,22 ^d	19,77 ^d	23,45 ^c
DMBA+PEG+C 25	27,56 $\pm$ 1,178 ^a	0,75 $\pm$ 0,07 ^c	32,00 ^d	68,00 ^d	39,65 ^d	28,11 ^a
DMBA+PEG+C 50	32,44 $\pm$ 1,56 ^c	0,19 $\pm$ 0,01 ^d	33,71 ^d	66,29 ^d	33,66 ^b	32,63 ^c

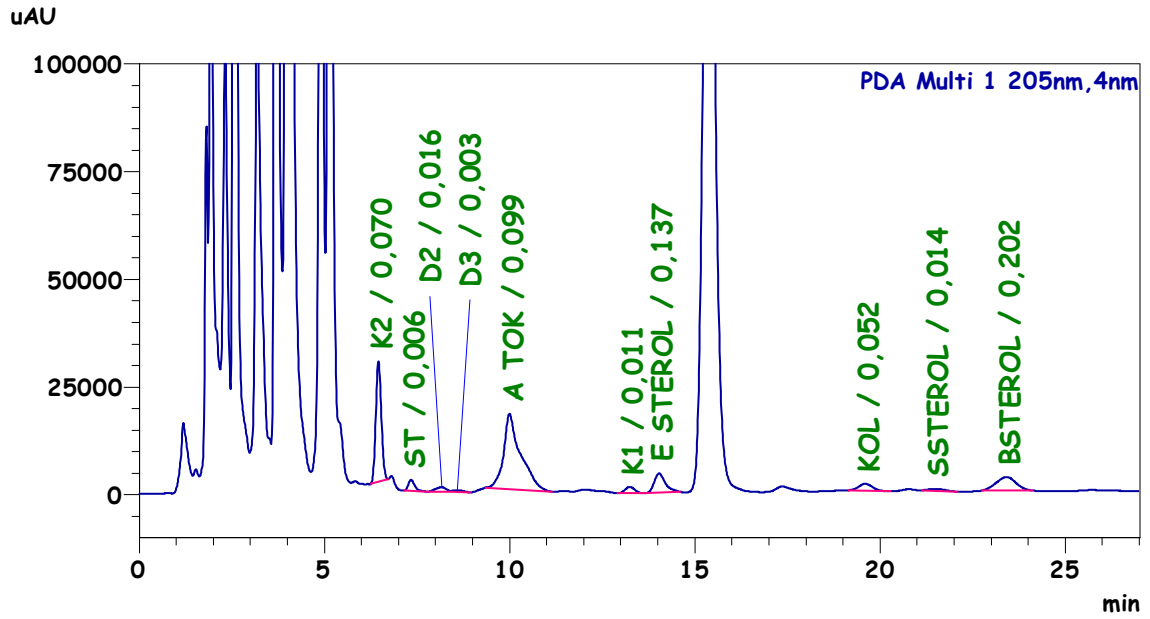
3.2.4. Krizin verilen grupların yağ asidi sonuçları

HPLC PDA dedektörü ve Cosmosil AR II kolon ile yapılan analiz sonucunda lipofilik vitaminlerin sonuçları Tablo 3.16 ve Tablo 3.17’de verilmiştir. Tablo 3.16’deki sonuçlarda K2 vitamini kontrol grubuna göre DMBA grubunda kısmen azaldığı halde ($p<0,05$), Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında ise belirgin düzeyde yükselmişti ($p<0,001$). Diğer gruplarda ise istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). δ -Tokoferol miktarı kontrol grubuna göre krizin ve PEG gruplarında kısmen artış gösterdiği halde, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında azaldı ($p<0,05$). Diğer gruplarda istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). D2 vitamin düzeyi DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında kısmen yüksekti ($p<0,05$), diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). D3 vitamin düzeyi kontrol grubuna göre susam yağı verilen grupta önemli düzeyde yükselmesine rağmen ($p<0,01$), diğer gruplarda azaldı ($p<0,05$, $p<0,001$). α -Tokoferol miktarı kontrol grubuna göre DMBA grubunda farklılık göstermediği halde ($p>0,05$), diğer bütün gruplarda farklı oranlarda yükseldiği gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). K1 vitamin düzeyi DMBA grubunda belirgin düzeyde artarken ($p<0,001$), krizin grubunda istatistiksel farklılık gözlenmedi ($p>0,05$), diğer gruplarda ise azaldı ($p<0,05$, $p<0,001$) (Tablo 3.16).

Fitosterollerden ergosterol düzeyi DMBA, Krizin ve PEG gruplarında artmıştı ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,05$), diğer gruplarda ise istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Stigmasterol düzeyinde gruplar arasında istatistiksel farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). β -Sitosterol düzeyi ise bütün gruplarda kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,05$) (Tablo 3.17). Krizin ile yapılan lipofilik vitaminler ve sterollere ait örnek kromatogramlar şekil 3.13. ve şekil 3.14.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan D, E, K ve fitosterollerin standart kromatogramı



Şekil 3.14. HPLC PDA dedektörü ile analizi yapılan D, E, K ve fitosterollerin susam yağı grubuna ait kromatogramı

Tablo 3.16. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların lipofilik vitaminlerin miktarları (µg/g hücre peleti)

Gruplar	K2	δ-Tokoferol	D2	D3	α-Tokoferol	K1
Kontrol	0,91±0,11	0,77±0,06	0,69±0,05	0,43±0,02	1,88±0,15	0,65±0,05
DMBA	0,66±0,09 ^b	0,74±0,05 ^a	0,88±0,06 ^b	0,20± 0,01 ^d	2,00±0,21 ^a	1,61±0,11 ^d
Krizin	0,88±0,08 ^a	0,91±0,07 ^b	0,72±0,07 ^a	0,21 ±0,02 ^d	2,76±0,34 ^c	0,67±0,04 ^a
PEG	0,89±0,07 ^a	0,95±0,12 ^b	0,71± 0,06 ^a	0,22± 0,03 ^d	4,19±0,56 ^d	0,35 ±0,01 ^d
Susam yağı	1,62±0,16 ^d	0,69±0,05 ^a	0,89±0,09 ^b	0,92±0,09 ^c	3,19±0,46 ^c	0,27±0,01 ^d
DMSO	0,82±0,09 ^a	0,74±0,12 ^a	0,69±0,04 ^a	0,32±0,04 ^b	2,58±0,44 ^b	0,53±0,02 ^b
DMBA+PEG+C 25	1,51±0,18 ^d	0,58±0,06 ^b	0,87±0,08 ^b	0,32±0,05 ^b	3,18±0,56 ^c	0,28 ±0,02 ^d
DMBA+PEG+C 50	1,58±0,22 ^d	0,54±0,05 ^b	0,89±0,09 ^b	0,26±0,05 ^d	3,05±0,60 ^c	0,38 ±0,02 ^d

Tablo 3.17. Gelişme ortamına Krizin eklenen grupların fitosterol miktarları (µg/g hücre peleti)

Gruplar	Ergosterol	Stigmasterol	β-Sitosterol
Kontrol	365,94±23,11	34,04±1,67	18,25±0,98
DMBA	530,88±27,76 ^d	38,42±1,43 ^a	44,15±0,78 ^c
Krizin	449,48±23,45 ^c	35,68±1,98 ^a	79,82±0,98 ^d
PEG	395,56±19,18 ^b	28,48±1,56 ^a	10,53±0,12 ^c
Susam yağı	370,92±17,45 ^a	29,30±1,09 ^a	41,16±0,99 ^c
DMSO	353,38±16,77 ^a	26,56±1,05 ^a	71,06±0,59 ^d
DMBA+PEG+C 25	351,72±21,67 ^a	27,42±1,54 ^a	51,25±0,59 ^c
DMBA+PEG+C 50	381,02±22,81 ^a	36,42±1,46 ^a	33,58±0,55 ^b

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında *in vitro* ve *in vivo* çalışma modellerinde bir kanser ajanı olan DMBA'ya karşı Rutin ve Krizin ve PEG'in *S. cerevisiae* kültür ortamında kompozit oluşturarak metabolik etkileri incelendi. Çalışma planımız içinde kontrol, DMBA, Rutin, Krizin, PEG, DMSO, Susam yağı ve kombinasyon grupları oluşturuldu. Çalışma iki bölüm halinde planlandı. Birinci bölümde Rutin flavonoidinin ilave edildiği gruplar ve ikinci bölümde de krizin flavonoidinin ilave edildiği gruplar kullanıldı.

DMBA yağda daha iyi çözündüğü için her iki çalışma grubunda da bağımsız olarak susam yağı grubu kullanıldı. Flavonoid moleküller olan rutin ve krizin ise DMSO içerisinde % 100 çözünmektedir. Bundan dolayı çalışmalara DMSO ilave edilen gruplar eklenmiştir. PEG maddesi ile polimer yapıda olup hidrofilik özellikte bir madde olduğu için suda kolayca çözünmektedir.

Rutin molekülü (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozit), tutku çiçeği, karabuğday, çay ve elma gibi bitkilerde bol miktarda bulunan bir flavonoldür. Bitkisel gıda maddelerinde bulunan hayati bir besin bileşenidir [27]. Şekil 1.1'de de görüldüğü gibi Rutin molekülü, rutosit, kuersetin-3-rutinosit ve sophorin olarak da bilinir ve glikozid yapıda bir flavonoid molekülüdür [28].

Krizin (5,7-dihidroksiflavon), *Passiflora caerulea* ve *Passiflora incarnata* bitki türlerinde, bal ve propolis bulunur. Krizinle yapılan bazı çalışmalarda hücre proliferasyonu, inflamasyon, anjiyogenez ve kanser metastazına bağlı seçici hücre sinyal mekanizmaları yoluyla potansiyel antikanser etkilerini gösterdiği belirtilmiştir.

4.1. Hücre yoğunluğu, Total protein, GSH, GSSG ve MDA Değerleri

Bulgularımıza göre 72 saat sonunda 600 nm'de spektrofotometre ile ölçülen hücre yoğunluğu değerlerinde rutin ilave edilen gruplarda istatistik farklılık bulunmadı. Ancak kontrol grubuna göre hücre peleti miktarlarında artışlar gözlemlendi (Tablo 3.1). Krizin verilen gruplarda da benzer sonuçlara rastlandı. Bu sonuçların nedeni hücre yoğunluğunda farklılık bulunmaması da kültürlerle ilave edilen maddelerin hücreler tarafından absorbe ederek hücre yapısına eklenmesinden ileri gelebileceği düşünülebilir.

Samarghantian çalışmasında prostat kanseri hücreleri üzerinde balın anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu ve bu etkilerin esas olarak krizin kaynaklı olduğunu ileri sürmüşlerdir[29]. Bu nedenle krizin hem kanser önleme hem de tedavi için potansiyel bir bileşik olabileceğini belirtmişlerdir. Daha önce de belirtildiği gibi Krizin (5, 7-dihidroksiflavon) bitkilerde, balda ve propoliste bol miktarda bulunan bir flavonoiddir. Krizin Güçlü anti-enflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir ve hücre döngüsü ilerlemesini bozarak hücre ölümünü destekler.

Çalışmamızda total protein miktarı rutin verilen gruplardan DMBA grubunda artış gösterdiği halde rutin, PEG, susam yağı ve 25 mg kombinasyon grubunda azalmıştı. DMBA grubunda protein miktarının artmasının DMBA'nın toksik etkisine karşı *S. cerevisiae*'nin kendi iç dinamiklerinde protein yapılı moleküllerin sentezini artırarak savunmaya geçtiği ileri sürülebilir. Tablo 3.2. incelendiğinde GSH ve GSSG'nin miktarlarında artışlar bulunmuştur. Özellikle GSH proteine bağlı antioksidan özellikli bir moleküldür. GSSG ise bu molekülün okside formudur.

Tiyollerin bir üyesi olan Glutatyon (GSH), antioksidan olarak önemli bir rol oynar ve bir merkaptan olarak tanımlanır. GSH, tripeptit bir yapıya sahiptir (g-glutamilsisteinilglisin) ve hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda milimolar konsantrasyonlarda bulunur. GSH' ın antioksidan özelliği, biyolojik işlevlerde en önemli konulardan biri olarak yer alır. Hidroksil radikal (OH), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit anyonu (O₂⁻) gibi radikallerin detoksifikasyonunda önemlidir. GSH hücrede indirgenmiş formda bulunmasına rağmen, antioksidan reaksiyonlar sırasında oksitlenir (GSSG). GSH ayrıca amino asitlerin taşınmasında, proteinlerin ve DNA'nın sentezinde önemli bir rol oynar [30].

Çalışmamızda MDA düzeyi kontrol grubuna göre DMBA grubunda yüksek bulunmuştur (Tablo 3.2). Bunun aksine rutin, PEG ve DMBA+PEG+Rutin 50 gruplarında azaldığı gözlenmiştir. Özellikle rutin grubunda MDA'nın düşük düzeyde bulunması antioksidan özelliğinden kaynaklanabilir. PEG grubunda azalması ise reaksiyon ortamında radikal oluşumuna neden olmamasından kaynaklandığını düşünmekleeyiz. PEG türevleri tıbbi amaçlı olarak birçok uygulamalarda kullanılmaktadır. Eğer MDA olarak bilinen lipid peroksidasyon ürünlerinde artış sağlamaya meyilli olsa bu alanlarda kullanılamaz.

Gegotek ve ark. Rutinin UV kaynaklı inflamasyonu ve protein ve transkripsiyonel düzeyde redoks dengesizliğini önlediğini, bunun da lipid, protein ve DNA korumasını desteklediğini. Sonuç olarak rutin, endokannabinoid sistemi ve apoptotik dengeyi düzenlediğini bildirmiştir.

Polifenolik yapıları nedeniyle flavonoidler, reaktif oksijen radikallerini (ROS) doğrudan temizlenmesi yoluyla serbest radikal kaynaklı hasarları önleyebilir. Rutin, hidroksil radikalleri ve süperoksit radikalleri gibi serbest radikallere elektron vererek nötralize ederek serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandıran daha kararlı, reaktif olmayan türlere dönüştürebilir [31]. Rutin ayrıca romatoid artrit lökositlerinde ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi ROS oluşumundan sorumlu enzimleri inhibe ederek oksidatif stresi önleyebilir [32].

ROS seviyeleri üzerindeki bu doğrudan etkilere ek olarak, rutin Cu, Zn SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini artırarak ve sıçan beyin hücrelerinde gözlemlenen GSH seviyelerini yükselterek antioksidan kapasitesini artırır [33]. Ayrıca, bu flavonoid siklooksijenazların ve lipoksijenazların aktivitelerini inhibe ederek insan nörofillerindeki proinflamatuvar süreçleri azaltır [30]. Yapılan bir çalışmada rutin uygulanan iskemik sıçanlarda böbreklerde lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyelerinde azalma görülmüştür [34]. Diğer bir çalışmada, bitki özlerinde bulunan rutin, çeşitli

radasyon türlerine maruz kalan memeli eşey hücreleri üzerinde canlılıklarını önemli ölçüde artırarak sitoprotektif etkiler gösterdiği belirlenmiştir [35].

Araştırmamızda redükte glutatyon (GSH) DMBA, Susam yağı ve DMBA+PEG+Rutin 25 gruplarında kontrol grubundan yüksekti (Tablo 3.2). GSH tripeptid yapıda bir moleküldür. Hidrojen peroksit gibi serbest radikal üretici ajanlara ve diğer bazı serbest radikallere karşı hücrede etkili bir savunma sistemine sahiptir.

Bu çalışma ile DMBA ilave edilen gruplarda GSH miktarının artması lipid peroksidasyona karşı hücrenin korunması amaçlanarak hücrenin korunması amaçlanmıştır. Aynı gruplarda lipid peroksidasyon belirteci olan MDA miktarının artması bu sonucu desteklemektedir.

Tablo 3.10'daki sonuçlar incelendiğinde, total protein miktarı DMBA, Krizin ve PEG gruplarında kısmen azalmıştır. MDA düzeyi ise krizin ve DMSO grupları haricinde diğer bütün gruplarda yüksekti. MDA'nın yüksek olduğu gruplarda GSH düzeyi de yüksekti. GSSG düzeyinin ise DMSO dışındaki bütün gruplarda kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edildi.

GSH miktarının MDA'nın artış gösterdiği gruplarda yükselmiş olması anlamlı bulunmaktadır. *S. cerevisiae* serbest radikale meyilli moleküllere karşı ve metabolik olarak oluşan serbest radikal oluşturunca ajanlara karşı birinci sırada yer alan GSH miktarını artırarak savunma yapmaktadır. MDA'nın artış gösterdiği gruplarda GSH'ında artış göstermesinin nedeni bu sonuçlardan kaynaklanmaktadır. GSSG'deki artışın ise lipid peroksidasyona karşı savunmada GSH'ın okside forma dönüşümünün hızlı olduğu göstermektedir. Glutatyon molekülünün aktif formu GSH ve radikaller ile etkileştikten sonra elektron kaybindan dolayı okside formu olan GSSG'ye dönüşmektedir.

4.2. Antioksidan Enzimler

Tablo 3.3'deki sonuçlar incelendiğinde SOD, CAT, GSHpx ve GST gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlenmiştir. Bilindiği gibi SOD enzimi oksijenli solunum yapan organizmalarda elektron taşınım sırasında oluşan süperoksit anyonunu hidrojen perokside çevirmektedir. Hidrojen peroksit yarı radikal bir moleküldür. *S. cerevisiae* aktif olarak oksijenli solunum yapmadığından SOD aktivitesi çok etkili olmayabilir. Ancak hidrojen peroksit GSH, CAT ve GSHpx enzimleri tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülerek etkisiz hale getirilir.

Bunların bu sebeplerden dolayı GSH miktarının yüksek olması bu enzimlere ihtiyaç duyulmamasından kaynaklanabilir. Yani oluşan hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ajanların GSH tarafından etkisiz halde getirildiği söylenebilir. Bundan dolayı rutin ilave edilen gruplarda bu antioksidan enzimlerin aktivitelerin azaldığı düşünülebilir.

Krizin'in ilave edildiği grupların antioksidan enzim sonuçları incelendiğinde Tablo 3.11'de SOD aktivitesi DMBA grubunda kısmen artarken, diğer gruplarda azalmıştır. CAT aktivitesi sonuçları rutin grubunun sonuçlarına benzer olduğu gözlenmiştir.

Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR) Susam yağı ve DMBA+PEG+Rutin 25 grubunda yükseliş göstermiştir. DMBA+PEG+C 50 grubu hariç diğer gruplarda ise azalmıştır (Tablo 3.12). GR NADPH'nın mevcudiyetinde GSSG'yi GSH'a dönüşümünü sağlayan antioksidan enzimidir. Ortamda GSSG ve NADPH olduğu zaman aktivitesi artmaktadır.

Flavonoidler, biyotransformasyon enzimleri ve ilaç taşıyıcıları ile etkileşim nedeniyle aynı anda uygulanan ilaçların farmakokinetiğini etkileyebilir [36]. Ayrıca, krizin, aromataz enzimini inhibe ettiğinden testosteron seviyelerini korumak için kullanılır.

In vitro çalışmalarda, krizin, CYP2C9 ve 3A4 dahil olmak üzere bazı CYP enzimlerinin güçlü bir inhibitörüdür. CYP katalizli oksidasyon, birçok ilacın ana eliminasyon yolu olduğundan, bu enzimlerin inhibitörleri, ilaçların farmakokinetiğini etkileyebilir. Krisin, de novo DNA sentezini etkiler ve sonuçta hücre sayısını azaltır. Yüksek yapıli organizmaların nötrofillerde, miyeloperoksidazın krizin kaynakli toksisiteden sorumlu olduğuna inanılmaktadır.

Çalışmamızda 3.12'de görüldüğü gibi GSHpx aktivitesi krizin, PEG, susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında yüksek bulundu. Tablo 3.10'da görüldüğü gibi GSH miktarı bu gruplarda da yüksekti.

GSHpx antioksidan enzimi hidrojen peroksiti ve lipid peroksitleri nötralize eden bir antioksidan enzimdir. Radikalleri nötralize ederken GSH'ı kullanmakta ve bu şekilde lipid peroksidasyona karşı savunma yapmaktadır. Çalışmamızdaki gruplara GSH'ın yüksek olması ve bu sonuçlara göre de GSHpx aktivitesindeki artışın uyumlu bir sonuç olduğu görülmektedir.

4.3. Yağ Asitleri

Bulgularımızda da belirttiğimiz gibi *S. cerevisiae*'nin hücre yapısında doymuş ve doymamış yağ asitlerini bulundurmaktadır. Doymuş yağ asitleri 10 C'lu ile 18 C'lular arasında yer almaktadır. Doymuş yağ asitleri içerisinde metabolik olarak en önemli olanı palmitik asittir (16:0). Palmitik asit yağ asidi sentezinin son ürünüdür. Yağ asidi sentezinin önemli enzimi yağ asidi sentetaz (FAS) enzimidir. FAS'ın son ürünü olan palmitik asit (16:0) hücrenin ihtiyacına ve sinyallerine göre farklı metabolik yollara kanallize edilir. Hücre membranının yapısını oluşturan fosfolipid sentezine veya elongaz (ELO) vasıtasıyla daha uzun zincirli yağ asitlerine dönüşür.

S. cerevisiae geliştirildiği hücre kültür ortamında bulunan yağ asitlerini alarak hücre yapısında kullanabilir. Bundan dolayı *S. cerevisiae* hücre peletinde bulunan 16:0'dan daha küçük karbonlu yağ asitleri 15:0, 14:0, 12:0 ve 10: gibi ya ortamdan hücre içine alınarak hücre yapısına katılmıştır ya da 16:0'ın beta oksidasyonu sonucu peroksizomlarda oluşmuştur.

Bütün kültürlerde standart besi ortamı kullanıldığına göre palmitik asit (16:0)'ten daha küçük karbon sayılı yağ asitlerinin miktarlarındaki değişimin beta oksidasyon sonucu oluşan karbon zinciri azalmasından kaynaklanabilir.

Bulgularımızda palmitik asit miktarı kontrol grubuna göre DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 azalmıştır (Tablo 3.4). Rutin, PEG ve DMSO gruplarında 16:0 düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olması FAS aktivitesinin yükselmesinden ve DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarındaki azalmasının nedeni ise FAS aktivitesinin azalmasından kaynaklanabilir. Kültür ortamına ilave edilen susam yağı içeriğinde palmitik asitin yeterli düzeyde bulunması FAS'ın aktivitesini azaltmaktadır. Aynı gruplarda stearik asit düzeyinin azalması (Tablo 3.4) bu sonucu doğrulamaktadır. Çünkü 16:0 düzeyinin yüksek olduğu gruplarda 18:0 düzeyi de yüksek bulunmuştur. Buradan çıkan sonuç 16:0 düzeyi arttığı zaman Elongaz enziminin de aktivitesi artarak 18:0 sentezi hızlanmaktadır.

Lipidler, tüm canlı organizmalarda bulunan ve bölümlere ayırma, enerji depolama ve enzim aktivasyonu ile ilgili bir dizi işlev sergileyen değerli bileşiklerdir. Ayrıca, bu bileşikler, yapının korunmasından, çözünen maddelerin hücre içine ve dışına taşınmasını ve hücrenin hayatta kalması için gerekli hücresel sinyalleme için kolaylaştırılmasından sorumlu olan plazma zarının ayrılmaz bir parçasıdır.

Saccharomyces'teki membran gliserolipidleri ve sfingolipidleri, uzunlukları 12 ila 24 karbon arasında değişen yağ asitlerini içerir. Uzun zincirli yağ asitleri üreten birkaç farklı metabolik yol yolu olduğu görülmektedir. De novo yolu, çözünür sitozol yağ asidi sentaz kompleksi (Fasp)1 içinde uzun zincirli yağ asit CoA'ları üretir, bu da 18 karbonlu ctadekanoik asit kadar uzun ürünler oluşturduğu bildirilmiştir (18:0). Ek olarak, *Saccharomyces*'in, Fasp'tan veya besin olarak türetilen yağ asit CoA'larını uzatabilen membrana bağlı enzim sistemleri içerdiği görülmektedir.

Tablo 3.13'deki tablodaki sonuçlar incelendiğinde, farklı zamanda yapılan ve krizin uygulanan gruplardan DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında da benzer sonuçlar bulunmuştur. Farklı zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların benzer olması bulgularımızdan elde ettiğimiz sonuçların tesadüf olmadığını göstermektedir.

Gliserofosfolipid türlerinin sentezi ve birleşmesinden sorumlu metabolik yollar, hücresel zar yapısının oluşturulmasında ve enerji homeostazının kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Gliserofosfolipid türlerinin sentezi, asetil-CoA'nın asetil-CoA karboksilaz tarafından malonil-CoA'ya ilk karboksilasyonu ile başlayan karmaşık bir süreçtir. Yağ açıl-CoA sentetaz (FAS) daha sonra asetil-CoA ve malonil-CoA'nın 16 ila 18 karbonlu en yaygın olan doymuş asit zincirlerine yoğunlaşmasını katalize eder. *S. cerevisiae*'de, açıl-CoA'nın yüksek bir oranı endoplazmik retikulumda (ER) stearyl-CoA desaturaz Ole1 tarafından katalize edilen mono doymamış yağ asidi oluşur. Daha sonra, doymuş ve doymamış asil-CoA, bileşimi, zincir uzunluğu ve doymamışlık

derecesi membran özelliklerini ve yapısını etkileyen çeşitli bir gliserofosfolipid ailesine birleştirilir [37,38].

S. cerevisiae hücre yapısında doymamış yağ asidi de bulunmaktadır. Bu doymamış yağ asitleri içinde tek çift bağlı olanlar 15:1, 16:1,n-7 18:1 n-9 ve 18:1 n-11 gibi yağ asitleridir. Tek çift bağlı yağ asitleri palmitik asit ve stearik asit gibi doymuş yağ asitlerinin 9-10. C atomları arasına Steroil CoA enzimi tarafından 1 adet çift bağın ilavesi ile sentezlenir.

Tablo 3.5'deki sonuçlarımıza bakıldığında palmitoleik asit miktarı rutin ilave edilen grupta kısmen artmış, PEG grubunda istatistiksel farklılık gözlenmemiştir. Ancak diğer gruplarda kontrol grubuna göre azalmıştır. Buradan şu sonuca gidebiliriz. Kültür ortamına ilave edilen maddelerin SCD olarak bilinen steroil CoA desaturaz enzim aktivitesini azaltmıştır. Rutin ilavesinin ise kısmen de olsa SCD aktivitesini artırmıştır.

Maya *Saccharomyces cerevisiae*'de, OLE1 geni tarafından kodlanan tek bir yağ asidi desaturazı vardır. Homodimer olarak işlev gören stearyl-CoA desaturazı, yağ asidi zincirinin 9 ve 10 numaralı karbonları arasında bir cis konumunda çift bağ oluşturur. Bu yağ asitleri palmitoleik (16:1 Δ^9 veya n-7) ve oleik asittir (18:1 Δ^9). Stearyl-CoA desaturazının anormal ekspresyonunun da hastalıkta rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır; memelilerde, belirli dönüştürülmüş hücrelerde apoptoza neden olabilen bir antikanser geni olan ORCTL3 tanımlanmıştır. Araştırmalar ORCTL3'ü stearyl-CoA desaturaz olarak tanımlamışlardır. Mayada ise stearyl-CoA desaturazın aşırı ekspresyonu invaziv büyümeye yol açtığı belirtilmiştir [39].

Yağ asidi desaturasyonu, farklı moleküler ve genetik aktörleri içeren oldukça karmaşık ve düzenlenmiş bir süreçtir. Sonuç olarak, yağ asidi desaturaz (FAD) enzimleri, belirli substratların farklı pozisyonlarında çift bağların tanıtılmasından sorumludur ve bu da çok çeşitli mono- ve poli-doymamış yağ asitleri ile sonuçlanır. Bu substrat özgüllüğü, hücrede farklı desaturazların çeşitli ifade ve işlevsellik profillerine yol açarak, çok çeşitli iç ve dış koşullara karşı farklı doku hücrelerinin tüm işlevsel ihtiyaçlarını karşılamayı mümkün kılar. Hayvansal organizmalarda, sadece SCD bu süreçte önemli bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda diğer desaturazlar da çevresel koşullara ve farklı dokuların işlevsel ihtiyaçlarına yanıt olarak önemli bir rol oynayabilir. Stearyl-CoA desaturaz (SCD) (EC 1.14.19.1), Endoplazmik Retikulum zarına bağlı bir Açıl-CoA desaturazdır.

Bu enzim, doymuş yağ asitlerinde (SFA'lar), esas olarak 16:0 ve 18:0'da 9, 10 pozisyonunda ilk cis-çift bağ tanıtarak sırasıyla 16:1n-7 ve 18:1n-9 gibi tekli doymamış yağ asitleri (MUFA'lar) üretir. SCD enzimi, NADH sitokrom b5 redüktaz ve sitokrom b5 ile birlikte bir multienzim sistemi oluşturur. Doymamışlık sürecinde, zarla bağlı sitokrom b5, elektronları NADH sitokrom b5 redüktazdan SCD'ye yanıl difüzyonla aktarır. Diğer FAD'lerde (Δ^5 ve Δ^6 FAD'ler) N-terminal Sitokrom b5 benzeri bir alan bulunur ancak SCD'de bulunmaz. Ancak, maya (*Saccharomyces cerevisiae*) SCD'de (OLE1) aktivitesi için gerekli olan C-terminal sitokrom b5 benzeri bir motif

bulunur. Bu enzimler, katalitik merkezdeki demir atomlarını bağladıklarından katalitik aktivitesi için gerekli olan kalıntıyı içeren üç histidin açısından zengin motif sunar. SCD, çoğu açıl lipit, membran fosfolipit, kolesterol ester ve trigliseritin oluşumu için temel substratlar olan MUFA biyosentezindeki temel enzimdir. Spesifik yağ açıl kompozisyonlarıyla gösterilen fosfolipit sınıflarının moleküler türleri, doğru bir hücresel işlev için gerekli olan membran özelliklerinin korunmasında önemli roller oynar.

Bu nedenle, hücre zarlarındaki yağ asidi (FA) doymamışlık seviyesi, balıklar da dahil olmak üzere canlı organizmalarda sıcaklık stresi adaptasyonunun önemli bir mekanizması olarak kabul edilir. Ek olarak, zarlardaki fosfolipit açıl kompozisyonunun değişmesi, kanserler, diyabet ve kardiyovasküler bozukluklar da dahil olmak üzere çok çeşitli potansiyel hastalıkların moleküler temeliyle yakından ilişkilidir.

18 C'lu tek çift bağlı yağ asitlerinden oleik asit (18:1) SCD enzimi ile stearik asitten sentezlenmektedir. Oleik asit miktarı ise DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında çok fazla düzeyde yüksek bulunmuştur. PEG ve DMSO gruplarında kontrol grubuna göre azalırken, rutin grubunda farklılık gözlenmemiştir. Oleik asit miktarının DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında yüksek olması susam yağı içeriğinde yüksek oranda oleik bulunmasından kaynaklanabilir. *S. cerevisiae* kültür ortamında bulunan yağ asitlerini hücre içine alarak hücre yapısında kullandığı bilinmektedir. Çalışmamızda 18 C'lu tek çift bağlı yağ asitlerinden 18:1 n-11 DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında artış göstermiştir. 18:1 n9t ise PEG ve DMSO grubunda artış gösterirken, DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında azalmıştır. 18:1 n-11 ve 18:1n-9 normal metabolizma sırasında oluşan yağ asidi formlarıdır.

Krizin verilen grubun Tablo 3.14'deki tek çift bağlı yağ asitlerinin değişimi incelendiğinde palmitoleik asit miktarının krizin verilen grupta da kısmen yükseldiği ve DMSO grubunda farklılık gözlenmediği belirlenmiştir. Rutin grubu çalışmasında olduğu gibi susam yağı, DMBA, PEG ve kompozit gruplarında azalmıştır. Yukarıda da belirttiğimiz gibi bu maddelerin kültür ortamına ilave edilmesi sonucu 16:0'dan 16:1 n-7 sentezini sağlayan SCD enzim aktivitesinin azaldığı söylenebilir.

Oleik asit miktarı Rutin grubu çalışmasında olduğu gibi Krizin, PEG ve DMSO grubunda çok yüksek düzeyde azaldığı halde, DMBA, Susam yağı, DMBA+PEG+R 25 ve DMBA+PEG+R 50 gruplarında ise artmıştır. Bu gruplardaki artışın nedeni DMBA'nın çözünmesinde kullanılan susam yağından kaynakladığı düşünülmektedir. Bireysel olarak Krizin, PEG ve DMSO SCD enzim aktivitesini azalttığı halde susam yağı bulunan ortamda 18:0'dan 18:1 n-9 sentezinde SCD enzim aktivitesi üzerinde etkisiz kalmaktadırlar.

18:1, n-11 düzeyi kontrol grubuna göre DMBA grubunda kısmen azalırken, Krizin ve DMSO gruplarında artış gözlenmiş, ancak kontrol grubuna göre PEG, susam yağı ve kompozit oluşturulan gruplarda daha yük bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Bu gruplarda 18:1 n-9 miktarında azalma olduğu gözlenmiştir. 18:1 n-9t düzeyi Krizin ve DMSO gruplarında kısmen artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.14).

Tablo 3.6 incelendiğinde çok çift bağlı yağ asitlerinden linoleik asit (18:2 n-6) ve linolenik asit (18:3 n-3) yağ asitlerinin bulunduğu gözlenmiştir. Birçok mantar hücresinde bitkilerde olduğu gibi Δ^{12} desaturaz ve Δ^{15} desaturaz enzimleri bulundurduğundan bu yağ asitlerini sentezlemektedir. *S. cerevisiae*'ni bazı suşlarında bu enzimler bulunduğu halde bazılarında ise bulunmamaktadır. Ancak *S. cerevisiae* ortamda bulunan yağ asidi moleküllerini hücre içine alarak membran yapısında kullanmaktadır.

Linoleik asit miktarı kontrol grubuna göre Rutin, PEG ve DMSO gruplarında çok fazla düzeyde azaldığı halde, susam yağı ve susam yağının kullanıldığı gruplarda ise çok fazla artış göstermiştir. Bunun nedeni susam yağı içeriğindeki linoleik asit moleküllerinin *S. cerevisiae* hücreleri tarafından alınarak kullanılmasından kaynakladığı düşünülebilir.

S. cerevisiae'nin zar lipidlerindeki yağ asitlerinin yaklaşık %70'i palmitoleik asit (16:1) ve oleik asitten (18:1) oluşur. Geriye kalan yağ asitleri doymuştur ve başlıca palmitik asitten (16:0) ve daha az miktarda stearik asitten (18:0) ve miristik asitten (14:0) oluşur. En bol bulunan doymamış yağ asitleri di- ve trienoik linoleik (18:2) ve oks-linolenik (18:3) türler olan diğer çoğu mantarın aksine, *S. cerevisiae* normal laboratuvar koşullarında yetiştirildiğinde yalnızca tekli doymamış asitleri sentezler [37,38,39,40,41].

Araştırmamızda toplam doymuş yağ asidi oranı kontrol grubuna göre rutin, PEG ve DMSO gruplarında yüksek, doymamış yağ asidi oranının ise susam yağ ilave edilen gruplarda yüksek olduğu belirlenmiştir. Toplam PUFA ve MUFA sonuçlarında da benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Krizin verilen grupların çok doymamış yağ asidi bileşimini içeren Tablo 3.15'deki sonuçlar incelendiğinde rutin grubunda sonuçlara benzer eğilimlerin olduğu belirlenmiştir. Yağ asitlerinin oranlarında değişimler olsa da Rutin verilen gruplardaki azalış ve artış eylemleri ile krizin verilen grupların eğilimlerinin benzer olduğu gözlenmiştir.

Kültür ortamına ilave edilen DMBA, DMSO, PEG, Susam yağı ve kompozitlerinin Yağ asidi metabolizması üzerinde çok önemli etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz. İlave edilen moleküllerden bazıları yağ asidini sentezleyen enzimlerin aktivitesini azaltırken bazı enzimler üzerinde de aktivite artırıcı etkilere sahip olmuşlardır. Bizim bulgularımızda elde ettiğimiz sonuçlara göre enzimlerin ürünleri olan yağ asidi miktarlarına göre tahminler yürütmekteyiz.

4.4. Lipofilik özellikteki moleküllerin değişimi

Çalışmamızdaki *S. Cerevisiae* peletlerinde lipofilik moleküller olarak K vitaminleri (K1 ve K2), D vitaminleri (D2 ve D3) E vitamini türevleri (δ ve α -Tokoferol) gibi yağda çözünen vitaminler ile fitosterollerden ergosterol, stigmaterol ve β -sitosterollerdir. Bu moleküllerden özellikle K1 vitamini, E vitamini türevleri ve fitosteroller bitkisel özellikteki organizmalar tarafından sentezlenirler. Bulgularımızda bu moleküllerin sonuçları rutin grubu için Tablo 3.7- Tablo 3.8’de gösterilmiştir. Krizin grubu için ise Tablo 3.16-Tablo 3.17’de gösterilmiştir. Bu moleküllerin analizleri HPLC cihazında PDA dedektörü ile yapılmıştır.

Özellikle K, D ve E vitaminleri düşük düzeyde sentezlenen moleküllerdir. Bulgularımızda bu moleküllerin değişimi incelendiğinde K 2 vitamin düzeyi kontrol grubuna göre DMBA kısmen azaldığı halde, susam yağı ve DMBA+PEG+C 25 gruplarında artış gösterdi. Buna karşılık rutin, PEG ve DMSO gruplarında ise yükselmişti. δ Tokoferol miktarı susam yağı grubu dışında diğer gruplarda çok fazla düzeyde yükseldi. α -Tokoferol miktarı ise DMBA, rutin, susam yağı ve kompozit oluşturulan gruplarda yükseldiği halde, PEG grubunda azaldı ve DMSO grubunda değişiklik göstermedi.

D3 vitamini DMBA grubunda kısmen artış göstermiş, susam yağı, DMBA+PEG+C 25 ve DMBA+PEG+C 50 gruplarında farklılık bulunmadığı halde, diğer gruplarda azalmıştı. K1 vitamin sentezi de DMBA grubunda yüksek bulundu, buna rağmen rutin ve PEG grubunda ise azalmıştı. Diğer gruplarda farklılık gözlenmedi (Tablo 3.7).

Bu moleküller içinde α -Tokoferol molekülü bütün hücrelerde hem antioksidan hem de metabolik olarak görevleri bulunmaktadır. Suda çözünmediği için hücrenin hidrofobik kısımlarında görev yapar ve lipid peroksidasyon zincirini kıran güçlü bir antioksidan moleküldür. Hücrelerin daha çok hidrofobik membran yapılarında yer alır. α -Tokoferol düzeyi özellikle susam yağı eklenen gruplar ile rutin grubunda artmıştır. Susam yağı grubunda yükselmiş olması, susam yağı ierğinde de vitamin E formu olan α -Tokoferol bulunmasından kaynaklı olabilir. Rutin grubunda artış göstermesi ise rutin hücredeki antioksidan kapasiteyi artırıcı rolünden kaynaklanabilir. Diğer vitamin gruplarında ise normal maddelerin dışında ortama ilave edilen moleküllerin bazılarında sentezi artırıcı rolü olurken bazılarında ise azaltıcı yönde etkileri olmuştur. Bunun nedeninin sentez yollarındaki enzimler üzerinde engelleyici etkilerinin olduğu düşüncesindeyiz.

Krizin verilen gruplarda ise K2 düzeyi susam yağı ve kompozit oluşturulan gruplarda yüksek, DMBA grubunda ise azalmıştır. (Tablo 3.16). D3 düzeyi susam yağı grubu haricindeki diğer gruplarda azalmıştı Buna karşılık α -Tokoferol düzeyi kontrol grubuna göre bütün gruplarda yüksek bulundu. En yüksek düzeydeki artış PEG, susam yağı, ve kompozit oluşturulan gruplarda gözlendi. *S. cerevisiae* kedisine ait olan bütün bileşikleri kendi genom yapısında bulunan bilgiye göre sentezlemektedir. α -Tokoferol de bu moleküllerden biridir. *S. cerevisiae* ortamda mevcut karbon

kaynaklarını kullanarak ihtiyaç duyduğu bütün molekülleri sentezleyebilir. PEG polimer yapılı bir moleküldür. *S. Cerevisiae*'deki enzimler polimey yapının bağlarını keserek bireysel moleküller şeklinde karbon kaynağı olarak kullanabilir. PEG ve PEG'in bulunduğu gruplarda buna benzer moleküllerin artışı bu düşünceye bağlayabiliriz. Susam yağı verilen grupta yüksek olması ise yağ yapısındaki α -Tokoferol içeriğinden kaynaklanmaktadır. K1 vitamin değerlerinde ise azalma gözlenmiştir. Buradan şu sonuca ulaşabiliriz. Hücre ortamda mevcut olan karbon kaynaklarını kullanarak ihtiyaç duyduğu molekülleri sentezlerken bütün maddeler için sonuç aynı değildir. Örneğin α -Tokoferol bütün hücrelerde olduğu gibi *S. cerevisiae* için de önemli bir moleküldür. α -Tokoferol 'ün hem antioksidan rolü hem de metabolik rolleri bulunmaktadır. Bundan dolayı α -Tokoferol GSH ve diğer önemli moleküller gibi sentezlenmesi öncelikli moleküller arasında yer almaktadır.

Lipofilik moleküllerden diğerleri ise fitosteroller olarak da bilinen ergosterol, stigmasterol ve betasitosterol molekülleridir. Bu moleküller bitkisel organizmalarda yer alır ve bitkilerde hücre zarı yapısının en önemli bileşenleridir. Ergosterol daha çok fungal hücrelerde bulunur ve membran yapısının en önemli yapısal bileşenidir. Ergosterol miktarının hücrede ozmotik dengenin bozulması ve stres durumunda miktarının arttığı ileri sürülmüştür. Sonuçlarımızda ergosterol miktarı kontrol grubuna göre DMBA grubunda önemli düzeyde yüksek olmasına rağmen, diğer gruplarda azalmıştı. DMSO grubunda farklılık görülmedi (Tablo 3.8).

DMBA grubunda stigmasterol ve β -sitosterol gibi moleküllerin de düzeyinin artmış olduğu gözlenmiştir. Stigmasterol ve β -sitosterol moleküllerin düzeyinin susam yağı ve kompozit oluşturulan gruplarda da yükseldiği belirlendi (Tablo 3.8). Buradaki yükselişin nedeni ise susam yağı yapısında yer alan stigmasterol ve β -sitosterol gibi moleküllerin olmasından kaynaklanabilir. Tablo 3.17'de görüldüğü gibi ergosterol düzeyi DMBA, Krizin ve PEG gruplarında yüksek bulunmuştur. β -sitosterol düzeyi DMBA grubunda da yüksek bulunmuştur. Bu sonuç rutin verilen gruplardaki sonuca uyumludur. β -sitosterol düzeyi PEG grubunda azaldığı halde diğer gruplarda yükselmişti. Stigmasterol düzeyinde ise gruplar arasında farklılık bulunmadı. Deney sonuçlarımıza bakıldığında zaman her iki deney grubu farklı zamanlarda yapılmıştır. Bundan dolayı bütün sonuçların % 100 oranında aynı çıkması mümkün değildir. Ancak bulgularımızda gözlemlediğimiz her iki grubun sonuçlarında birçok verilerin benzer eğilimde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak *S. cerevisia*'nin kültür ortamındaki karbon kaynaklarını hücre içine alarak sentezlediği proteinlere ek olarak, kültür ortamına ilave edilen rutin, krizin, PEG gibi moleküller ile bunların çözünmesini sağlayan susam yağı ve DMSO maddesi hücre metabolizması üzerinde hem pozitif yönde hem de negatif yönde atkilere sahip olduğu gözlenmiştir.

Total protein miktarında bazı gruplarda artış olurken bazı gruplarda azalma gözlenmiştir. *S. cerevisiae* hücresi kendini koruması gereken oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerde azalma gösterirken GSH seviyesinde bir artış olmuştur, GSSG miktarında ise MDA ile birlikte bir

artış olduğu görölmüştür, α -tokoferol düzeyinde ise bir artış olmuştur. Bu sonucun maya hücresinin serbest radikaller karşısındaki savunmasının bir sonucu olduğu düşünölmektedir. *S. cerevisia* üzerinde yapılan bu deneylerin sonuçlarının insan hücrelerine yakın özellikler olmasından dolayı, rutin ve krizin ile ilgili sonuçların kanserojen ve toksik maddelere karşı savaşmada etkili olduğu ve antioksidan özellikler taşıdığı düşünölebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., & Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 25(22), 5243.
- [2] Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The pharmacological potential of rutin. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(2), 149-164.
- [3] Mani, R., & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145, 187-196.
- [4] Pizzimenti, S., Heffler, E. M., Gentilcore, E., Raie, A., Bussolino, C., Nebiolo, F., & Giovanni, R. (2014). Macrogol hypersensitivity reactions during cleansing preparation for colon endoscopy. *J Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 2(3), 353-354.
- [5] Shi, L., Zhang, J., Zhao, M., Tang, S., Cheng, X., Zhang, W., ... & Wang, Q. (2021). Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale*, 13(24), 10748-10764.
- [6] Castanho, G. M., Regitano, J. B., Tornisiello, V. L., & Abdalla, A. L. (2009). Sorption and mobility of polyethylene glycol (PEG 4000) in tropical soils. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91(7), 1263-1271.
- [7] Baird, J. A., Olayo-Valles, R., Rinaldi, C., & Taylor, L. S. (2010). Effect of molecular weight, temperature, and additives on the moisture sorption properties of polyethylene glycol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(1), 154-168.
- [8] Moritz, M., & Geszke-Moritz, M. (2015). Recent developments in the application of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Adv Clin Exp Med*, 24(5), 749-758.
- [9] Pelham, R. W., Nix, L. C., Chavira, R. E., Cleveland, M. V., & Stetson, P. (2008). Clinical trial: single-and multiple-dose pharmacokinetics of polyethylene glycol (PEG-3350) in healthy young and elderly subjects. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 28(2), 256-265.
- [10] Gajdová, M., Jakubovsky, J., & Váľky, J. (1993). Delayed effects of neonatal exposure to Tween 80 on female reproductive organs in rats. *Food and chemical toxicology*, 31(3), 183-190.
- [11] Satari, A., Ghasemi, S., Habtemariam, S., Asgharian, S., & Lorigooini, Z. (2021). Rutin: A flavonoid as an effective sensitizer for anticancer therapy; insights into multifaceted mechanisms and applicability for combination therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021(1), 9913179.
- [12] Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q. (2022). Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. *Molecules*, 27(9), 2901.
- [13] Jangid, A. K., Solanki, R., Patel, S., Medicherla, K., Pooja, D., & Kulhari, H. (2022). Improving anticancer activity of chrysin using tumor microenvironment pH-responsive and self-assembled nanoparticles. *ACS omega*, 7(18), 15919-15928.
- [14] Burgess, Sean M; Powers, Ted; and Mell, Joshua Chang (2017) Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Genetic Organism. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- [15] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- [16] Karatepe, M. (2004). Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America*, 22(4), 362-365.

- [17] Yilmaz, Ö., Keser, S., Tuzcu, M., Güvenc, M., Cetintas, B., Irtegün, S., ... & Sahin, K. (2009). A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. *J. Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 343-34.
- [18] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179, 588-590.
- [19] Dileepkumar, H. V., & Ritesh, K. R. (2018). Dichlorvos induces differential oxidative stress in the brain regions of rat. *Adv Pharmac J*, 3(5), 150-156.
- [20] Ahmed, A. Y., Aowda, S. A., & Hadwan, M. H. (2021). A validated method to assess glutathione peroxidase enzyme activity. *Chemical Papers*, 75, 6625-6637.
- [21] Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*, 175(2), 408-413.
- [22] Korolyuk, M. A., Ivanova, L. I., & Majorova, I. T. (1988). Methods of definition of catalase activity. *Lab Manuals*, 1, 16-19.
- [23] Hara, A., Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90, 420-426.
- [24] Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- [25] Katsanidis, E., & Addis, P. B. (1999). Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1137-1140.
- [26] Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D. I., & Rios-Vazquez, N. J. (2006). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, α -tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *Journal of Chromatography A*, 1105(1-2), 135-139
- [27] Christie, W. W. (1998). Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids. *Analysis*, 26(3), 34-39.
- [28] Ganeshpurkar A. and Saluja Ajay K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25 (2), 249-264
- [29] Krept, S., knapp, M., & Krept, I. (1999). Extraction of Rutin from Buckweath (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and determination of capillary Electrophoresis. *J. Agricultural and Food chemistry*, 47(11), 4649-4652.
- [30] Samarghandian S, Afshari JT, Davoodi S. (2011). Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clinics*. 2066(6):1073-1079.
- [31] Öztürk, S., Cerit, I., Mutlu, S., & Demirkol, O. (2017). Enrichment of cookies with glutathione by inactive yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*): Physicochemical and functional properties. *Journal of Cereal Science*, 78, 19-24.
- [32] Ghiasi, M., Azadnia, A., Arabieh, M., & Zahedi, M. (2012). Protective effect of rutin (vitamin p) against heme oxidation: a quantum mechanical approach. *Computational and Theoretical Chemistry*, 996, 28-36.
- [33] Ostrakhovitch, E. A., & Afanas'ev, I. B. (2001). Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochemical Pharmacology*, 62(6), 743-746.

- [34] Annapurna, A., Ansari, M. A., & Manjunath, P. M. (2013). Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 17(4).
- [35] Bouriche, H., Miles, E. A., Selloum, L., & Calder, P. C. (2005). Effect of Cleome arabica leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72(3), 195-201.
- [36] Korkmaz, A., & Kolankaya, D. (2010). Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *Journal of Surgical Research*, 164(2), 309-315.
- [37] Sunada, S., Fujisawa, H., Cartwright, I. M., Maeda, J., Brents, C. A., Mizuno, K., ... & Uesaka, M. (2014). Monoglucosyl-rutin as a potential radioprotector in mammalian cells. *Molecular Medicine Reports*, 10(1), 10-14.
- [38] El Senosi, Y. A., Omayma, A., Elmaged, A. D. A., & Ali, M. A. (2018). Biochemical study on the regenerative effect of bee venom on experimentally induced diabetes. *World J Pharm Pharm Sci*, 10, 209-25
- [39] Greenwood, B. L., Luo, Z., Ahmed, T., Huang, D., & Stuart, D. T. (2023). *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta 9$ -desaturase Ole1 forms a supercomplex with Slc1 and Dga1. *Journal of Biological Chemistry*, 299(7).
- [40] Willey, M., Ochs, M., Busse, C., & McDonough, V. (2020). A transcriptional regulatory system of the *S. cerevisiae* OLE1 gene responds to fatty acid species and intracellular amount, and not simply membrane status. *Journal of Lipids*, 1), 3903257.
- [41] Bossie, M. A., & Martin, C. E. (1989). Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6409-6413.

ÖZGEÇMİŞ

██████████

██████████

10/10/2014

██████████

103

████████████████████

103

████████████████████

████████████████████

5
