

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİNİN DNA VE
PROTEİNLERDE MEYDANA GETİRDİĞİ OKSİDATİF
HASARA KARŞI DEVE DİKENİ (*Silybum marianum* L.)
TOHUMUNUN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nesrin İNCEÖREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
Mayıs 2018**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Nesrin İNCEÖREN tarafından yapılan “İleri Glikasyon Son Ürünlerinin DNA ve Proteinlerde Meydana Getirdiği Oksidatif Hasara Karşı Deve Diken (Silybum marianum L.) Tohumunun Koruyucu Etkisinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı

Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN

Üye: Prof. Dr. Göksel KIZIL (Danışman)

Üye: Dr.Öğrt. Üyesi Nevin ARSLAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/05/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca kıymetli bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan kendisinden çok şey öğrendiğim değerli bilim insanı ve hocam Prof. Dr. Murat KIZIL'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam süresince desteği, bilgisi, güler yüzü ile bana hep güven veren motivasyonumu artıran değerli hocam Prof. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bizden desteklerini ve bilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP Fen 15008 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a teşekkürler.

Tez çalışmasında kullanılan *Silybum marianum* bitki tohumunu temin eden Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Süleyman KIZIL'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya laboratuvar imkânı sağlayıp Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasında yardımcı olan Fen Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince Biyoorganik Araştırma Laboratuvarında beraber çalıştığım bilgi ve tecrübeleri ile bana yardım eden ve destekleyen kıymetli hocalarım Dr. Sevil EMEN, Dr. Sevcan ALTAŞ ve çalışma arkadaşlarım Hayrettin Dinç ve Feryal AKAY BÜLBÜL'e teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük katkıları olan her daim bana yardım edip yol gösteren teşekkürün az kalacağı güler yüzlü ve samimi hocam'a Dr. Bircan ÇEKEN'e teşekkür ederim.

Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarımıza teknik desteklerinden dolayı İhsan ZEYREK ve Askeri YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana destek olan beni koşulsuz şartsız seven benim başarılarımla mutlu olan dünyadaki en değerli varlıklarım ailem annem Edibe İNCEÖREN, babam Remzi İNCEÖREN ve canım kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMA ve SİMGELER	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Tip I Diyabet İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)	1
1.1.2. Tip II diyabet İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus	2
1.2. Glikozilasyon ve Protein Glikasyonu.....	2
1.3. Fruktoz Absorpsiyonu, Metabolizması ve Metabolitler.....	3
1.4. Fruktoz ve Sağlık Sorunları.....	5
1.5. Protein Glikasyonunun Kimyası.....	6
1.5.1. Protein Glikasyonu: Erken Evre.....	6
1.5.2. Protein Glikasyonu: Ara Evre.....	7
1.5.3. Protein Glikasyonu: İleri Evre.....	8
1.6. AGE Oluşumunun Diğer Yolları.....	8
1.6.1. Otooksidatif Glikasyon (Wolf patway)	9
1.6.2. Shiff Bazı Fragmentasyonu (Namiki pathway)	9
1.6.3. Glikooksidasyon Reaksiyonları.....	10
1.7. Glikasyonu Etkileyen Faktörler.....	11
1.8. Protein Katlanmasının Dikarboniller ile İlişkisi.....	11
1.9. DNA'nın Glikasyonu.....	13
1.10. AGE'lerin Karakterizasyonu.....	14
1.10.1. Floresans Çapraz Bağlı AGE'ler.....	14
1.10.2. Non-Floresans Çapraz Bağlı AGE'ler.....	16
1.10.3. Floresans Non-Çapraz Bağlı AGE'ler.....	16
1.10.4. Non-Floresan Non-Çapraz Bağlı AGE'ler.....	17
1.11. AGE'lerin Eksojen Kaynakları.....	17
1.12. AGE'lerin Biyolojik Etkileri (reseptöre bağlı etkiler)	19
1.13. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri.....	21
1.14. Glikasyona Karşı Doğal Savunma Mekanizmaları.....	24

1.15.	AGE Ölçüm Yöntemleri.....	25
1.16.	Doğal Glikasyon İnhibitörleri.....	26
1.17.	Anti-MG ve Anti-AGE Bileşikleri.....	38
1.18.	Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	30
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	33
3.	MATERYAL ve METOT.....	37
3.1.	Materyal.....	37
3.1.1.	Çalışmada Kullanılan Bitkinin Monografisi.....	37
3.1.1.1.	Silmarinin Kimyasal Bileşimi.....	37
3.1.1.2.	Silmarinin Sağlık Faydaları.....	38
3.1.1.3.	Silmarinin Farmakolojik Özellikleri.....	39
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
3.1.3.	Kullanılan Aletler.....	40
3. 2.	Metot.....	41
3.2.1.	Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	41
3.2.2.	Total Fenolik Bileşen Miktar Tayini.....	41
3.2.3.	Total Flavonoid Bileşen Miktar Tayini.....	42
3.2.4.	İndirgeme Gücü.....	43
3.2.5.	ABTS Radikal Katyonunu Söndürme Aktivitesi.....	43
3.2.6.	<i>İn Vitro</i> olarak BSA'nın Glikasyonu.....	44
3.2.6.1.	BSA'nın Fruktoz ile Glikasyonu.....	44
3.2.6.2.	Total AGE Floresans Ölçümü.....	45
3.2.6.3.	Fruktozamin Testi.....	45
3.2.6.4.	α -Dikarbonil Bileşiklerinin Tayini.....	45
3.2.6.5.	Protein Karbonil Miktar Tayini.....	46
3.2.6.6.	Protein Glikasyonunun SDS-PAGE Karakterizasyonu.....	46
3.2.6.7.	Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması.....	46
3.2.7.	<i>İn Vitro</i> olarak DNA'nın Glikasyonu.....	47
3.2.7.1.	DNA'nın Lizin ve Metilglioksal ile Glikasyonu.....	47
3.2.7.2.	DNA'nın Şeker ve Şeker Fosfatları ile Glikasyonu.....	47
3.2.7.3.	DNA'nın Fruktoz ile İnkübasyonu.....	48
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	49
4.1.	Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miltar Tayini.....	49
4.2.	İndirgeme Gücü.....	49

4.3.	ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi.....	50
4.4.	<i>İn Vitro</i> Olarak BSA'nın Glikasyonu.....	50
4.4.1.	Total AGE Floresans Ölçümü.....	50
4.4.2.	Fruktozamin Testi.....	52
4.4.3.	α -Dikarbonil Tayini.....	53
4.4.4.	Protein Karbonil Miktar Tayini.....	55
4.4.5.	Glikolizlenmiş Proteinin SDS-PAGE Karakterizasyonu.....	56
4.5.	<i>İn vitro</i> Olarak DNA'nın Glikasyonu.....	59
4.5.1.	DNA'nın Lizin ve Metilglioksal ile Glikasyonu.....	59
4.5.2.	DNA'nın Şeker ve Şeker Fosfatları ile Glikasyonu.....	63
4.5.3.	DNA'nın Fruktoz ile İnkübasyonu.....	65
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	67
5.1.	Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktarları.....	68
5.2.	İndirgeme Gücü Tayini.....	70
5.3.	ABTS Radikal Katyonunu Söndürme Aktivitesi.....	71
5.4.	<i>İn Vitro</i> Olarak BSA'nın Glikasyonu.....	72
5.4.1.	Total AGE Floresans Yoğunluğu.....	72
5.4.2.	Fruktozamin Testi.....	74
5.4.3.	α -Dikarbonil Oluşumunun İnhibisyonu.....	75
5.4.4.	Protein Karbonil Miktar Tayini.....	76
5.4.5.	Glikolizlenmiş Protein SDS-PAGE Karakterizasyonu.....	78
5.4.6.	<i>İn Vitro</i> Olarak DNA'nın Glikasyonu.....	79
5.4.6.1.	DNA'nın Lizin ve Metilglioksal ile Glikasyonu.....	79
5.4.6.2.	DNA'nın Şeker ve Şeker Fosfatları ile Glikasyonu.....	81
5.4.6.3.	DNA'nın Fruktoz ile İnkübasyonu.....	82
6.	KAYNAKLAR	85
	ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÖZET

İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİNİN DNA VE PROTEİNLERDE MEYDANA GETİRDİĞİ OKSİDATİF HASARA KARŞI DEVE DİKENİ (*Silybum marianum* L.) TOHUMUNUN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nesrin İNCEÖREN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2018

Diabetes mellitus (DM), başlıca hiperglisemi ile karakterize metabolik bir sendrom olup, diyabetli hastaların uzun dönem hiperglisemiye maruz kalmaları sonucu nefropati, nöropati, retinopati ve ateroskleroz gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır. Kanda yüksek seyreden şeker düzeyleri sonucu oluşan ileri glikasyon son ürünlerinin (advanced glycation end-products, AGE) bu komplikasyonların gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Proteinlerin amino gruplarının glukoz ve diğer indirgen şekerlerle enzimatik olmayan, kendiliğinden gerçekleşen tepkimesi glikasyon olarak adlandırılır. Glikasyon, fizyolojik sistemlerde kendiliğinden meydana gelen hasarların en önemli nedenidir. Her ne kadar glukoz vücut sıvılarında bulunan başlıca indirgen şeker ise de karbonhidrat metabolizmasının fosforile ara ürünleri çok daha etkili glikasyon ajanlarıdır. Güçlü indirgen bir şeker olan fruktoz, glukozdan 7-9 kat daha etkili olarak protein glikasyonuna neden olur. Son yıllarda yüksek fruktozlu mısır şurubu şeklindeki fruktozlu yiyeceklerin ve içeceklerin kullanımı devamlı olarak artmıştır. Fruktoz iştah baskılanmasında etkileri olan insülin ve leptin salgılanmasını etkilemediğinden, aşırı fruktoz tüketimi obezite, diyabet ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı için risk faktörüdür.

Bu tez çalışmasında *Silybum marianum* tohumunun etanol:su (1:1) ekstaktının öncelikle diyabette belirgin bir şekilde artış gösteren serbest radikalleri söndürme etkisi araştırıldı. Bu amaçla total fenolik ve flavonoid bileşen miktarı tayini, indirgeme gücü ve ABTS radikal katyonunu söndürme aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Daha sonra *S. marianum*'un Bovin serum albumin/Fruktoz sistemi ile modifiye edilen proteinler üzerine etkileri ve oksidatif DNA hasarını önlemede antiglikasyon etkileri araştırıldı. Sonuç olarak *S. marianum*'un galik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarı $262,70 \pm 13,84$ µg GAE/mg ekstrakt, quercetine eşdeğer toplam flavonoid eşdeğeri $10,50 \pm 1,01$ µg QUE/mg ekstrakt, ABTS radikal katyonu kullanılarak serbest radikal süpürme etkisi % 70.4 ve Fe^{+3}/Fe^{+2} 'ye indirgeme gücü olduğu tespit edildi. Bulgularımız, *S. marianum*'un fruktozamin, α -dikarbonil, protein karbonil miktarı ve oksidatif DNA hasarının oluşumunu önlemede belirgin bir inhibisyon etkisi ile antiglikasyon ajanı olma potansiyeline sahip olduğunu da göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: AGE, Diabetes Mellitus, *Silybum marianum*, Glikasyon, Antioksidant

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF THE SEEDS OF *SILYBUM MARIANUM* AGAINST ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS INDUCED OXIDATIVE DNA AND PROTEIN DAMAGE

MSc. THESIS

Nesrin İNCEÖREN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2018

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic syndrome characterized particularly by hyperglycemia which causes diabetes patients to develop microvascular and macrovascular complications such as nephropathy, neuropathy, retinopathy and atherosclerosis. It is stated that the advanced glycation end products (AGE) arisen from high blood-glucose levels takes part in the development of these complications.

The non-enzymatic spontaneous reaction of the amino- groups of the proteins with glucose and other reductant sugar is called “glycation”. Glycation is the number one cause of the spontaneously occurring damages in physiological systems. Even though glucose is the primary reductant sugar found in body fluids, the phosphoryl byproducts of the carbohydrate metabolism are far more potent glycation agents. Being a strong reductant sugar, fructose causes protein to glycation with 7-9 times more potency compared to glucose. The use of fructose added food and beverages (high fructose corn syrup) have continually been increased (pastry, candies, soda etc.). Since fructose does not interfere with the secretion of insulin and leptin which have effects over appetite suppression, fructose overconsumption is a risk factor for obesity, diabetes and nonalcoholic liver disease.

In this thesis, the effect of the ethanol/water (1:1) extract of *Silybum marianum* seeds on *in vitro* evolution of free radical scavenging activity was examined. It is known that a significant increase in free-radical production is a result of diabetic complications. For this purpose, total phenolic and flavonoid content, reducing power and ABTS radical cation scavenging activities were investigated. Then, the effects of *S. marianum* on the proteins modified by the BSA/Fructose system and the antiglycation effects in the prevention of oxidative DNA damage were investigated. Consequently, the total amount of phenolic component of *S. marianum* was found to be $262,70 \pm 13,84$ μg gallic acid equivalent (GAE)/mg extract, total flavonoid was found to be $10,50 \pm 1,01$ μg quercetin equivalent (QUE)/mg extract, ABTS radical cation scavenging activity was found to be % 70.4 and ferric ion reducing power was found. The results suggest that the seeds extract of *S. marianum* has the potential to be used as an anti-glycating agents with a significant inhibitory effect in preventing the formation of fructosamine, α -dicarbonyl, protein carbonyl and oxidative DNA damage.

Keywords: AGE, Diabetes Mellitus, *Silybum marianum*, Glycation, Antioxidant

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1.	<i>S. marianum</i> bitkisinin etanol:su (1:1) ekstraktının içindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik ve quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları	49
Çizelge 4.2.	<i>S. marianum</i> etanol:su (1:1) ekstraktının ve B ₆ vitaminleri ile türevlerinin DNA 'da lizin/MG/Fe ⁺³ ile oluşturulan hasarı önleme etkileri (%)	60
Çizelge 4.3.	Ticari silmarinin etanol:su (1:1) ekstraktının ve B ₆ vitaminleri ile türevlerinin DNA 'da lizin/MG/Fe ⁺³ ile oluşturulan hasarı önleme etkileri (%)	62
Çizelge 4.4.	Şeker ve şeker fosfatlarının DNA'da oluşturduğu hasarın incelenmesi	64
Çizelge 4.5.	Fruktozun DNA'da meydana getirdiği hasarın etkileri	65

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Basitleştirilmiş fruktozdan okzalot yolu ve glikolizis yolu	4
Şekil 1.2.	Shiff bazı oluşumu ve onu takiben Amadori düzenlenmesi	7
Şekil 1.3.	Amadori ürününden elde edilen Deoksiosonlar	7
Şekil 1.4.	Deoksiosondan 1-amino-1,4-dideoksioson oluşumu	8
Şekil 1.5.	Pirralin ve pentosidin	8
Şekil 1.6.	Otooksidatif glikasyon (Wolf pathway)	9
Şekil 1.7.	Namiki yoluyla AGE oluşumu	10
Şekil 1.8.	Hidroksil radikalının glikooksidasyonu	11
Şekil 1.9.	Hidroksil radikal oluşumu	11
Şekil 1.10.	Şeker ve şeker degradasyon ürünleri ile DNA'nın reaksiyonundan CEdG _{A,B} 'nin oluşumu; (a) şeker ve şeker ürünleri (glukoz, fruktoz, MG, GO vb.) ile non enzimatik reaksiyon	14
Şekil 1.11.	Glikasyon esnasında oluşan α -dikarbonil türevleri	15
Şekil 1.12.	Çapraz bağlı floresans AGE'lerin oluşumu	15
Şekil 1.13.	Floresans çapraz bağlı AGE'lere örnekler	16
Şekil 1.14.	Non-floresans çapraz bağlı AGE'lere örnekler	17
Şekil 1.15.	Floresans non-çapraz bağlı AGE'lere örnekler	17
Şekil 1.16.	Non-floresan non-çapraz bağlı AGE'lerin örnekleri	18
Şekil 1.17.	RAGE şematik gösterimi	20
Şekil 1.18.	AGE-RAGE etkileşiminin biyolojik etkileri	21
Şekil 1.19.	Moleküler oksijenin süperoksit dismutaz tarafından hidrojen peroksit ve suya indirgenmesi	23
Şekil 1.20.	Haber Weiss reaksiyonu	24
Şekil 1.21.	Peroksizomal katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından hidrojen peroksit detoksifikasyonu	24
Şekil 1.22.	Glikasyona uğramış proteinlerin enzimatik onarımı (deglikasyonu)	26
Şekil 1.23.	Doğal olarak oluşan glikasyon inhibitörleri	28

Şekil 1.24.	Sentetik glikasyon inhibitörleri	29
Şekil 3.1.	Gallik asitin yapısı	41
Şekil 3.2.	Quercetinin yapısı	42
Şekil 3.3.	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonikası)(ABTS)'nin persülfatla oksidasyonu	44
Şekil 4.2.	<i>S. marianum</i> bitki tohumunun etanol:su(1:1) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi.	49
Şekil 4.3.	<i>S. marianum</i> bitkisinin etanol:su ekstraktının farklı konsantrasyonlarının ABTS radikali üzerindeki söndürücü etkisi	50
Şekil 4.4.1.1.	BSA/fru/AG (500 µg/ml), BSA/fru/ <i>S. marianum</i> (500 µg/ml), BSA/fru/ticari silmarin (500µg/ml), sistemlerinin total floresans yoğunluğu	51
Şekil 4.4.1.2.	BSA/fru/ <i>S. marianum</i> (50-500 µg/ml), sisteminin total AGE floresans yoğunluğu	51
Şekil 4.4.1.3.	BSA/fru/ticari silmarin (50-500 µg/ml), sisteminin total AGE floresans yoğunluğu	52
Şekil 4.4.2.1.	BSA/fru/Aminoguanidin (AG) ve BSA/fru/ <i>S. marianum</i> sisteminde inkübasyon sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi	52
Şekil 4.4.2.2.	BSA/fru/Aminoguanidin (AG) ve BSA/fru/ticari silmarin sisteminde inkübasyon sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi	53
Şekil 4.4.3.1.	BSA'nın Aminoguanidin (AG) varlığında fruktoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α -dikarbonil ürünlerinin oluşumu üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi	53
Şekil 4.4.3.2.	<i>S. marianum</i> etanol:su(1:1) ekstraktının BSA/fru'nun inkübasyonu sonucu oluşan α -dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektroskopik olarak incelenmesi	54
Şekil 4.4.3.3.	Ticari silmarin ekstraktının BSA/fru'nun inkübasyonu sonucu oluşan α -dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektroskopik olarak incelenmesi	54
Şekil 4.4.4.1.	BSA/fru sisteminde Aminoguanidin ve <i>S. marianum</i> bitki ekstraktının varlığında protein karbonil miktarındaki değişikliğin spektroskopik olarak incelenmesi	55

Şekil 4.4.4.2.	BSA/fru sisteminde Aminoguanidin ve ticari silmarin bitki ekstraktının varlığında protein karbonil miktarındaki değişikliğin spektroskopik olarak incelenmesi	55
Şekil 4.4.5.1.	Fruktoz ile glike olan proteinin AG varlığında SDS-PAGE profili	56
Şekil 4.4.5.2.	Fruktoz ile glike proteinin <i>S. marianum</i> varlığında SDS-PAGE profili	57
Şekil 4.4.5.3.	Fruktoz ile glike proteinin ticari silmarin varlığında SDS-PAGE profili	58
Şekil 4.5.1.1.	<i>S. marianum</i> bitkisinin etanol:su(1:1) ekstraktının ve B ₆ vitamini ile türevlerinin lizin/MG/Fe ⁺³ varlığında pBR 322 plazmid DNA'sında oluşturulan hasarın Agaroz Jel Elektforezi ile önleme etkisinin incelenmesi	59
Şekil 4.5.1.2.	Ticari silmarinin etanol:su (1:1) ekstraktının ve B ₆ vitamini ile türevlerinin lizin/MG/Fe ⁺³ varlığında pBR 322 plazmid DNA'sında oluşturulan hasarın Agaroz Jel Elektforezi ile önleme etkisinin incelenmesi.	61
Şekil 4.5.1.3.	PBR 322 plazmid DNA'sında Lizin/MG/Fe ⁺³ ile oluşan hasarın ve Lizin/Fe ⁺³ /Şeker/şeker fosfatları ile oluşan hasar ile kıyaslanmasının Agaroz Jel Elektforezi ile incelenmesi.	63
Şekil 4.5.1.4.	PBR 322 plazmid DNA'nın fruktoz ile 0, 3, 5 ve 7 günlük inkübasyonunun Agaroz Jel elektforezi ile incelenmesi	65
Şekil 5.1.	Bazı tipik flavonoidlerin yapısı	68
Şekil 5.2.	Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	69
Şekil 5.3.	Silmarin bileşenlerinin temel yapıları	70
Şekil 5.4.	Lizil ve glioksal ile protein karbonilasyonunun DNPH ile belirlenmesi	77

KISALTMALAR

ABTS	: 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ACEIs	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri
AGEs	: İleri glikasyon son ürünleri
ARBs	: Anjiyotensin reseptör blokerleri
ATP	: Adenozin trifosfat
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CEL	: Karboksietil lizin
CML	: Karboksimetil lizin
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GO	: Glioksal
GSH	: Glutasyon
MG	: Metilglioksal
PLP	: Pridoksal-5-fosfat
P	: Pridoksin
Fru	: Fruktoz
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
BSA	: Bovin serum albümin
3-DG	: 3-deoksiglukazon
AG	: Aminoguanidin
PM	: Pridoksamin
RAGEs	: İleri glikasyon son ürünleri reseptörleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
WHO	: Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ

Küresel ölçekte bir sağlık sorunu haline gelen diyabet tüm dünyada görülme sıklığı hızla artmakta olan kronik bir metabolizma bozukluğudur. Dünyada ilk beş sıradaki ölüm nedenlerinin içinde kalp hastalıkları ve kanserden sonra en önemli ölüm nedenidir (Elosta ve ark. 2012). Birleşmiş Milletler kendi tarihinde ilk kez, bulaşıcı olmayan bir hastalığa karşı dünyadaki tüm kuruluşların bir ortak strateji oluşturması yönünde karar almıştır. Çünkü diyabet ortalama insan ömrünü kısaltan, hızla ilerleyen, bütün organlarda bozukluk yapabilen, şu anda çağımızın en önemli hastalıklarından bir tanesidir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation-IDD) 2015 diyabet atlası tahminlerine göre; 11 yetişkinden 1'i diyabetli (415 milyon), 2 diyabetli yetişkinden 1'ine (% 46,5) teşhis konulmamış yani diyabetli olduğunu bilmiyor, küresel sağlık harcamalarının % 12'si, diyabete harcanıyor (673 milyar ABD Doları) 7 doğumdan 1'i gebelik diyabetinden etkileniyor, diyabet hastalarının dörtte üçü (% 75) düşük ve orta gelir düzeyindeki ülkelerde yaşıyor, 542.000 çocuk tip 1 diyabet hastası, her 6 saniyede 1 kişi diyabet hastalığından hayatını kaybediyor.

Diyabet Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sınıflandırılmıştır.

1. Tip I diyabet insüline bağımlı Diabetes mellitus (IDDM)
2. Tip II diyabet insüline bağımlı olmayan Diabetes mellitus (NIDDM)

1.1. Tip I Diyabet İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)

Tip I Diabetes mellitus, kronik ve ömür boyu süren bir hastalıktır. Bu hastalıkta pankreasta yapılan insülin adı verilen hormon, çok az üretilmediği veya hiç üretilmediği için kandaki şekerin (glukozun) enerjiye dönüşmek üzere hücre içine girmesi mümkün olmamakta ve kanda glukoz seviyesi yükselmektedir.

Tip I diyabetin bilinen nedeni otoimmünitedir. Yani vücudu hastalıklara karşı koruyan savunma sistemi çeşitli nedenlerle vücudun normal hücrelerini tanımayıp saldırmakta ve tahrip etmektedir. Otoimmünite dışında genetik yatkınlık da Tip I diyabette risk faktörüdür. Tip I diyabet, bu hastalığa genetik yatkınlığı olan kişilerde genellikle viral enfeksiyonlar, stres veya travma gibi bir olay sonrasında tetiklenmektedir.

1.1.2. Tip II Diyabet İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM)

Tip II Diabetes Mellitus; hemen her zaman insülin direnci ile beraber olan insülin sekresyonundaki defekt(ler)den kaynaklanan, diyabetin en sık görülen formudur. Sinsi ve ilerleyici bir hastalık olan Tip II diyabetin yaygınlığı arttıkça, diyabet ve komplikasyonlarına bağlı morbidite ve mortalitenin artması nedeniyle günümüzün en büyük sağlık sorunlarından biridir.

Diabetes mellitus'da gözlenen karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temelinde insülinin hedef dokulardaki etkilerinin eksikliği vardır. Diyabetin metabolik sorunlarının yanı sıra, bu hastaların uzun dönem hiperglisemiye maruz kalmaları nefropati, retinopati ve ateroskleroz gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine de neden olmaktadır. Komplikasyonlar özellikle glukozun insülininden bağımsız olarak hücre içine girdiği kalp, sinir sistemi, küçük kan damarları gibi dokularda daha sık görülmektedir (Nessar, 2005). Kanda yüksek seyreden şeker düzeyleri sonucu oluşan ileri glikasyon son ürünlerinin (advanced glycation end-products, AGE) bu komplikasyonların gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir.

1.2. Glikozilasyon ve Protein Glikasyonu

Zar proteinler ile hücre dışı proteinlerinin bir kısmı sentezlendikten sonra, yapılarına değişik oligosakkarid üniteleri takılır ve bu tür modifikasyonlar söz konusu proteinlerin yapıları ve fonksiyonları için önemlidir. Proteinlerin karbohidratlar ile yapısal modifikasyonu hücrenin endoplazmik retikulum ile golgi organellerinin zarlarında bulunan enzimler tarafından katalizlenir ve karbohidratlar proteinlerin asparajin, serin veya treonin aminoasitlerinin yan zincirlerine glikozidik bağ ile bağlanır. Proteinlerin karbohidratlarla bu tür tepkimeleri son derece özgüdür, enzimatik olarak katalizlenir ve proteinlerin sentezinden sonraki bu tür modifikasyonu protein glikozilasyonu olarak bilinir.

İndirgen şekerler ile şekerlerin metabolik türevleri, herhangi bir enzim tarafından katalizlenmeden de proteinler ile tepkimeye girebilirler. Tepkimenin hızı ortamdaki indirgen şeker ile serbest amino grubunun konsantrasyonu ve sıcaklığa bağlıdır. İndirgen şekerlerin proteinlerle kendiliğinden gerçekleşen bu modifikasyonu

protein glikasyonu olarak adlandırılır. Sadece proteinler değil; serbest amino asitler, küçük peptidler, serbest amino grubu içeren diğer biyomoleküller (örn. nükleik asitler ve fosfolipitler) de glikasyona uğrayabilir (Zhang, 2009). Glikasyon 1912 yılında Fransız kimyacı Louis Maillard tarafından araştırılıp keşfedilmiştir. Kahverengi pigment ve melanoidin oluşumunu glukoz-lizin çözeltisinin ısıtılması sonucunda gözlemlemiştir. Bu nedenle bu reaksiyon Maillard reaksiyonu olarak isimlendirilmiştir. Maillard reaksiyonu gıdalarda bulunan amino grupları ile karbonil grupları arasındaki tüm reaksiyonları kapsar. Bunlar arasında aminler, amino asitler ve proteinlerin sekerlerle, aldehitlerle, ketonlarla ve lipit oksidasyon ürünleriyle reaksiyonları sayılabilir (Jing ve Kitts 2004).

Vücut sıvılarında en çok bulunan karbonhidrat glukozdur ve bu nedenle glikasyondan sorumlu başlıca molekül glukozdur (Gemayel ve ark. 2007). Fakat fruktoz, glukozdan 7-9 kat daha etkili olarak protein glikasyonuna neden olur (Gaby 2005).

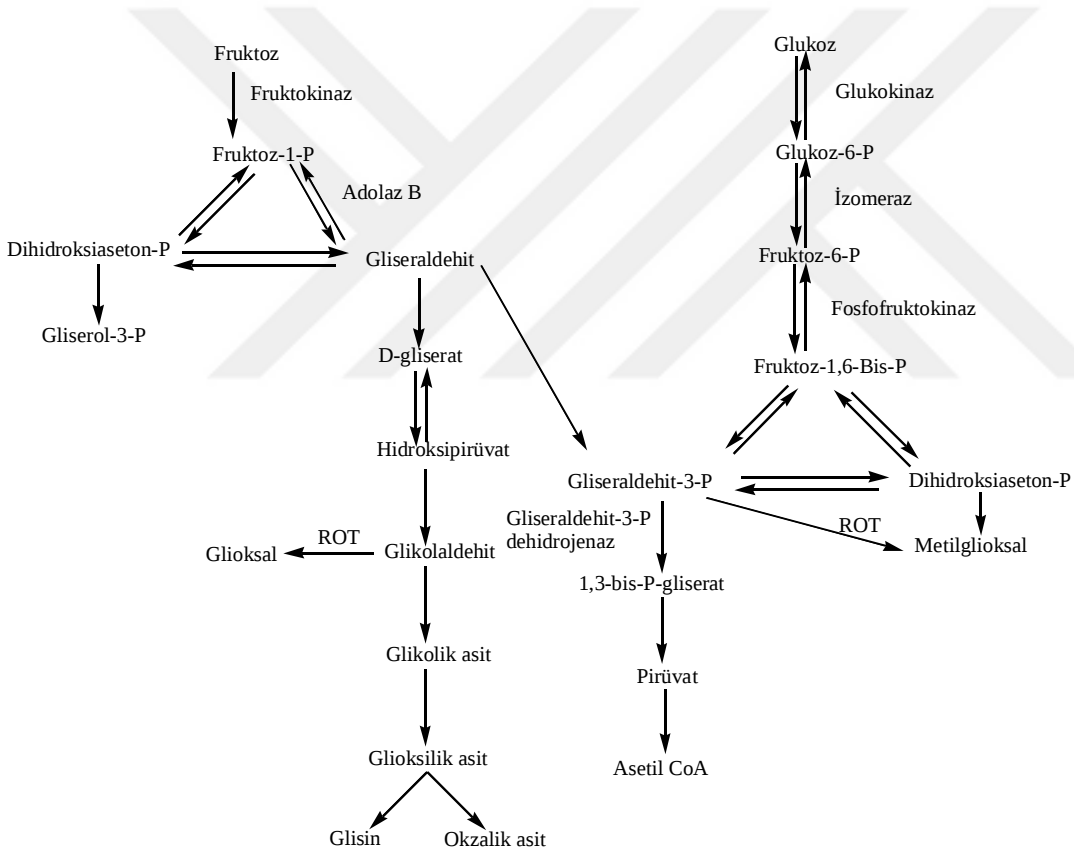
1.3. Fruktoz Absorpsiyonu, Metabolizması ve Metabolitleri

Sükroz gibi disakkaritler ince bağırsağa alınır ve orada hidrolazlar ile katalizlenerek glukoz ve fruktoz monosakkaritlerine ayrılır. Bu iki monosakkaritin absorpsiyonu birbirinden ayırıcı bir şekilde farklıdır. Glukoz bağırsak epitel hücrelerinin apikal membranı üstünde yerleşmiş olan sodyum bağımlı taşıyıcı glukoz transporter 4 (GLUT4) tarafından emilir. Glukozun aksine fruktoz ise oniki parmak bağırsağı ve ince bağırsakta kolaylaştırılmış difüzyon ile GLUT5 taşıma proteinleri ile emilir (Bray ve ark. 2004). Bu yüzden bu son işlem sodyuma bağlı değildir ve enerji gerektirmez (Havel 2005).

Glukoz ve fruktoz metabolizması da birbirinden farklıdır. Glukoz metabolizması fosfofruktokinaz ve insülin tarafından sıkıca düzenlenir. Glukoz pankreatik beta hücrelerinde insülin salınımını başlatır ve insülin, insülin duyarlı dokularda glukoz alıp depolamak üzeri sinyal gönderir. İnsülin GLUT4 ekspresyonunu da düzenler (Czech 1995). İntrasellüler olarak glukoz glukozkinaz tarafından glukoz-6-fosfata fosforile edilir ve daha sonra glikolizis yoluna girer (Şekil 1.1.). Glukoz metabolizması ve glikolizis ATP ve sitrat tarafından allosterik olarak inhibe edilen fosfofruktokinaza bağlıdır (Havel 2005). Aksine fruktoz çoğunlukla karaciğerde metabolize edilir ve süreç

insüline bağımlı değildir. Fruktoz metabolizması fosfofruktokinazı atlar ve fruktoz ATP ve fruktokinaz tarafından fruktoz-1 fosfata fosforile edilir (Ouyang ve ark. 2008).

Fruktoz-1-fosfatın aldolaz ile kataliziyle glikolizis yolunda ara ürünler olan dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehite dönüşür (Şekil 1.1). Dihidroksiaseton fosfat trigliserit sentezinin gliserol kısmını böylece sağlayan gliserol-3-fosfata dönüşebilir (Havel 2005). Gliseraldehit-3-fosfat yağ asitlerinin sentezi için substrat sağlayan pirüvat dehidrojenaz ile katalizlenen asetil-CoA'yı oluşturan piruvatu üretmek için de devam edebilir. Fruktoz hem gliserol-3-fosfat hem de yağ asitleri sentezi için substrat sağlayarak *de nova* trigliserid sentezini başlatır (Mayes 1993).



Şekil 1.1. Basitleştirilmiş fruktozdan okzalit yolu ve glikolizis yolu

Fruktoz gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfat'a ayrılır bu triozlar oksalat oluşturan bir dizi reaksiyonlar geçirir. Bu yol gliserat, hidroksipirüvat, gliksaldehit, gliksal ve gliksilat ara ürünlerini kapsar (Danpure ve Rumsby 2004). Ayrıca reaktif dikarboniller olan gliksal ve metilgliksal da oluşturur. Gliksal gliksaldehidin otooksidasyonundan oluşurken, metilgliksal ise gliseraldehit-3 fosfat dehidrojenaz

(GAPDH) aktivitesi hidrojen peroksidaz tarafından inhibe edildiğinde biriken dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit fosfat tarafından oluşturulur (Chatham ve ark. 1989, Abordo ve ark. 1999, Barngrover ve Dills Jr 1983).

1.4. Fruktoz ve Sağlık Sorunları

Fruktoz tüketimi batı diyetinde son yıllarda önemli derecede artmaktadır. 1977 yılında toplam fruktoz alımı tahmini olarak, toplam enerjinin %8,8'i iken bu oran 2000'li yıllarda % 11,5'ine yükselmiştir (Bray ve ark. 2004). Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması Anketine göre Amerika fruktoz tüketimi 1977'de günlük 37,0 gramdan 2008'de günlük 54,7 grama çıkmıştır (Vos ve ark. 2008). Ana artış kaynağının yüksek fruktozlu mısır şuruplarınca zengin olan meşrubatlar olduğu iddia edilmektedir (Nielsen ve Popkin 2004).

Yüksek fruktozlu mısır şurupları 1970'li yıllarda bulundu. Raf ömrü ve maliyet açısından avantajlı olduğundan dolayı daha sonraki yıllarda gittikçe yaygınlaşarak kullanıldı (Bray ve ark. 2004). Yüksek fruktozlu mısır şurupları mısır nişastasından çeşitli miktarlarda fruktoz, glukoz ve dekstrozun izomerizasyonu ile üretilir.

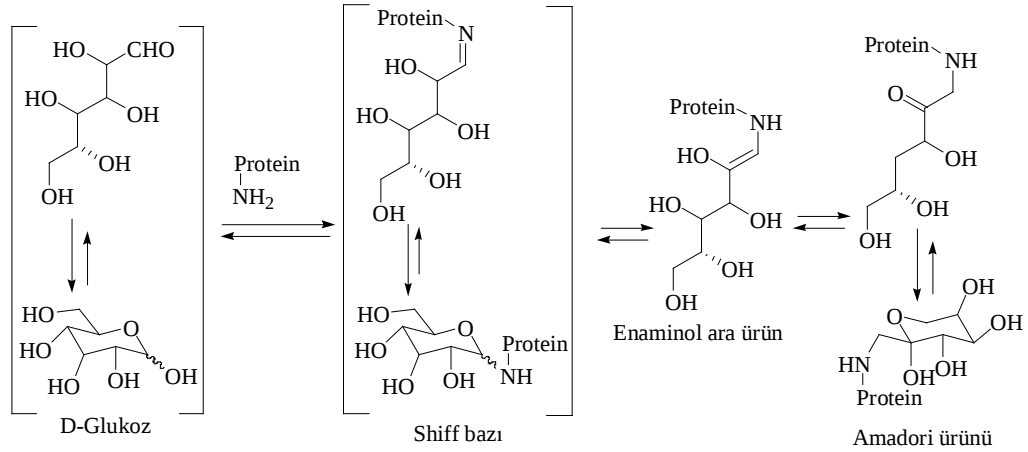
Eskiden beri birçok araştırmacı hem insan hem de hayvanlarda fruktoz tüketiminin güvenilirliğini araştırmıştır ve fruktoz tüketiminin artmasının birçok sağlık sorunuyla bağlantılı olduğu sonucuna varmıştır. Fruktoz, birçok moleküler sinyalleşme faktörlerinin deregülasyonunda metabolik sendromun da işin içinde olduğunu göstermiştir (Rutledge ve Adeli 2007). Metabolik sendrom obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon gibi patolojilerin bir toplamıdır. Fruktoz metabolizması hem ratlarda hem de insanlarda lipid metabolizmasının değiştirilmesiyle yakından ilişkilendirilir (Tappy ve ark. 2010). Fruktoz tüketiminin artması çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) triaçilgliserol klirensini düşürme ve hepatik *de novo* lipogenesis uyarımıyla plazma trigliseridlerinde artışa sebep olabilir (Faeh ve ark. 2005). Lipidlerdeki bu artış insanda hepatik insülin duyarlılığında azalma ve visceral yağ, intrahepatik yağda artışa sebep olabilir (Tappy ve ark. 2010). Fruktoz metabolik sendromların ilerlemesine sebep olan plazma ürik asit seviyesinde artışa sebep olabilir (Miller ve Adeli 2008). Glukozun aksine fruktoz alımı pankreatik beta hücrelerinde glukoz taşıyıcı tip5 (GLUT5)'in ekspresyonunun eksikliğinden dolayı leptin sekresyonunu uyarmaz. Leptin tokluk hissini artırır ve leptin uyarımı eksikliği ile

fruktozca zengin bir beslenme vücut yağında artışa sebep olan açlık ve yeme isteğini uzatabilir (Saad ve ark. 1998, Bray ve ark. 2004). Leptin uyarılmasının eksikliği ile birlikte yağ metabolizmasında değişiklikler yapma yeteneğine sahip olan fruktoz obeziteyi artırır. Genel olarak fruktoz alımı ve özellikle yüksek fruktozlu mısır şurubu kullanımı amerikadaki obezite prevalansı ile yakından ilişkilidir (Bray ve ark. 2004). Fruktoz tüketimi diyabet, karaciğer yağlanması ve hipertansiyon gibi kronik hastalıkları da kapsar. Ayrıca temel vitamin eksikliği ve artmış yağ tüketimi gibi batı diyetindeki diğer bileşenler de bu kronik hastalıkların oluşmasına katkı sağlayabilir.

1.5. Protein Glikasyonunun Kimyası

1.5.1. Protein Glikasyonu: Erken Evre

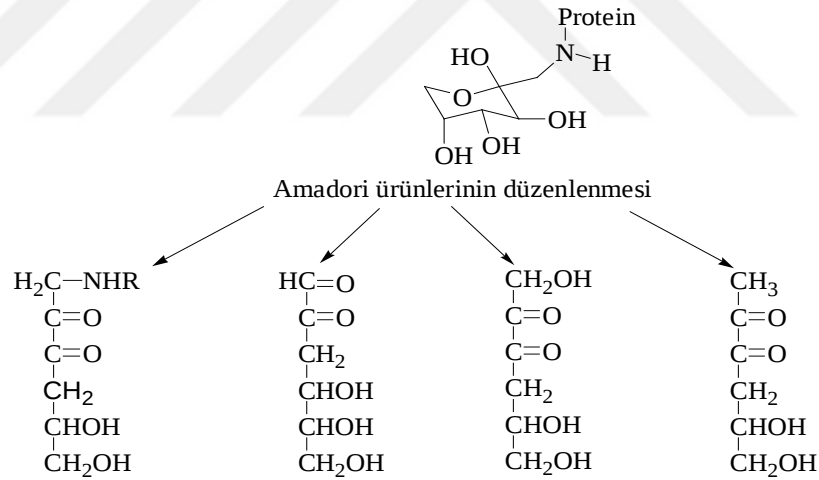
Glikasyon tepkimesinin ilk basamağı, glukoz gibi indirgeyici bir şekerin karbonil grubunun, tipik olarak proteinlerdeki lizin amino asidinin yan zinciri olan ϵ -amino grubu ile kondensasyonudur. Tepkimede su çıkması ile önce ketimin yapıdaki “Shiff bazı” ara ürünü oluşur. Bu ara ürün stabil değildir; ya su katılmasıyla tepkime tersine döner ya da tersinmez olarak stabil bir ürün olan ketoamin formuna kendiliğinden çevrilir. Stabil ketoamin formunun oluşumu “Amadori düzenlenmesi” olarak adlandırılır. Amadori ürününün düz ve halkasal formları birbiriyle denge halindedir (Nursten, 2005). Erken evrenin kinetiği, su aktivitesi, ortam sıcaklığı, karbonil karbon elektrofilitesi ve kan içinde asiklik formda bulunan şeker miktarına bağlıdır (Yaylayan ve ark. 1994). Protein pKa’sı, amino grupları ve molekül içindeki konumları protein glikasyonunun erken aşamasını etkiler (Spiro 2002) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Schiff bazı oluşumu ve onu takiben Amadori düzenlenmesi

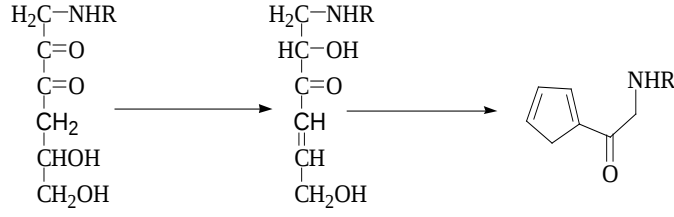
1.5.2. Protein Glikasyonu: Ara Evre

Protein glikasyonunun ara aşaması Heyns ve Amadori ürünlerinin dehidrasyonu üzerinden deoksioson'a degradasyonu ile başlar.



Şekil 1.3. Amadori ürününden elde edilen Deoksiosonlar

Deoksiosonların oluşumunun (Şekil 1.3.). asidik koşullar altında şeker kalıntısının 2,3 veya 1,2 enolizasyonu yoluyla ilerlediği düşünülmektedir (Yaylayan 1994). Deoksiosonların kimyası amino-karbonil grubu ile gerçekleşen bir dizi olası dönüşümleri varsaymaktadır (Şekil 1.4.). İlk enolizasyon redüktoz oluşumuna yol açar, ki bu da aminoasetil furana uyan bir siklizasyon geçirir (Leonil ve ark. 1997).

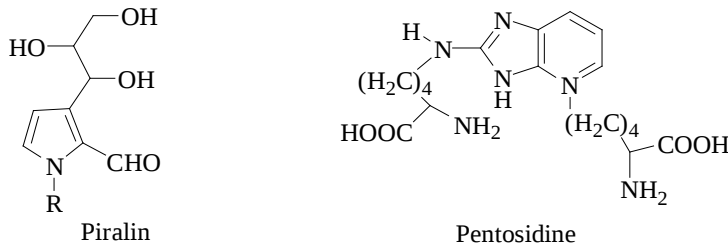


Şekil 1.4. Deoksiosondan 1-amino-1,4-dideoksioson oluşumu

1.5.3. Protein Glikasyonu: İleri Evre

Protein glikasyonunun ara evresi sırasında oluşan protein glikasyon ürünlerinden elde edilen heterojen bir organik molekül grubunu sunar. Örneğin deoksiosonlar molekül içi dönüşümler ve moleküller arası dönüşümlere uğrayarak, pırralin ve pentosidin oluşumuna yol açabilirler (Dills 1993).

AGE'ler floresan ve floresan olmayan ve çapraz bağlı veya çapraz bağlı olmayanlar şeklinde olabilirler.



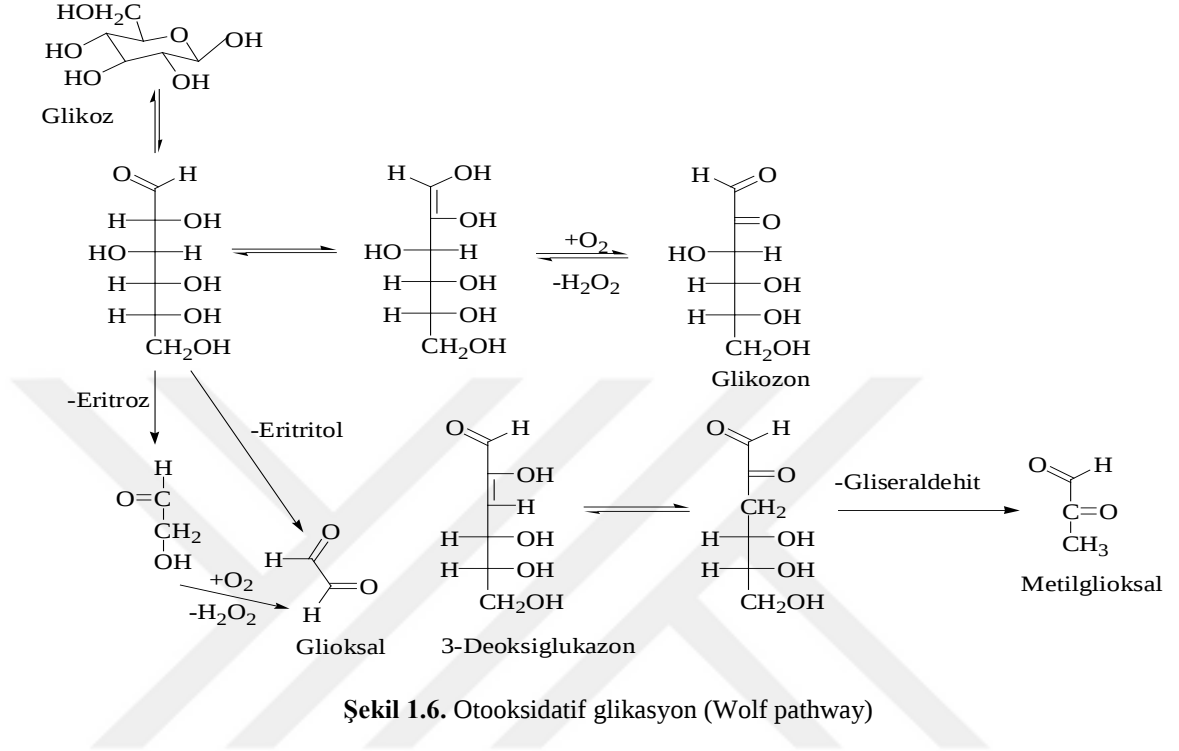
Şekil 1.5. Pırralin ve pentosidin

1.6. AGE Oluşumunun Diğer Yolları

1.6.1. Otoksidatif Glikasyon (Wolf patway)

Monosakkaritlerin otoksidasyonu şekerin α -hidroksikarbonil grubu ile oksijen arasındaki enzimatik olmayan bir reaksiyondur. Prosesin başlıca ürünleri α -oksoaldehit ve hidrojen peroksittir. Serbest radikallerin bu süreçte önemli rol oynadığı ve reaksiyonun başlangıç monosakkaritlerinin enolizasyonu ile başlatıldığı

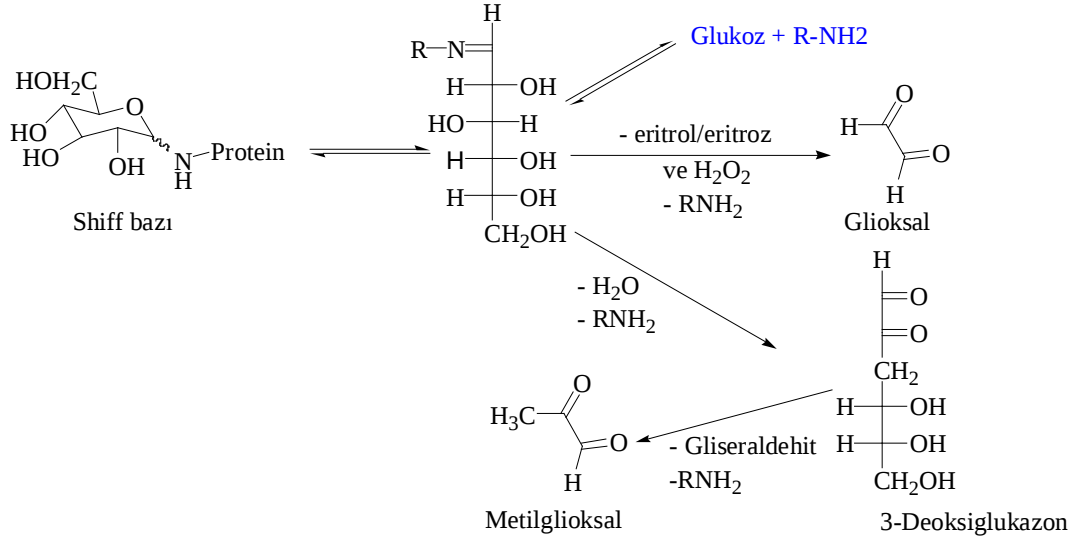
ileri sürülmüştür (Şekil 1.6.). Bu reaksiyon Wolf ve arkadaşları tarafından 1984'te keşfedildi (Wolff ve Dean 1987).



Dikarbonil bileşikleri ile birlikte, glikozon ve bir dizi ilave AGE ürünleri oluşturulur. Böylece glüköz molekülü ya eritroz ya da eritritol kaybeder glioksal ve 3-deoksiglukazon oluşur (Monnier 2003).

1.6.2. Schiff Bazı Fragmentasyonu (Namiki pathway)

Bazı durumlarda, Schiff bazı amadori düzenlenmesine girmez ancak AGE'lerin üretimine yol açan bir dizi eliminasyon reaksiyonları geçirir. Bu eliminasyon reaksiyonları metilglioksal, glioksal ve glikozon gibi kararsız bir dizi dialdehit ve primer amin'in salınmasına yol açar (Ferreira ve ark. 2003). Bu ürünler ve karşılık gelen reaksiyon yolu ilk olarak Namiki ve Hayashi (1983) tarafından tanımlanmıştır (Şekil 1.7.).

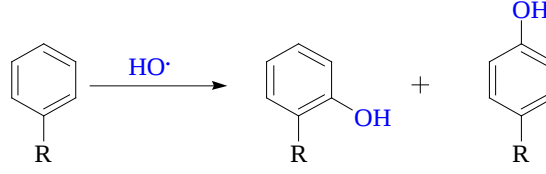


Şekil 1.7. Namiki yoluyla AGE oluşumu

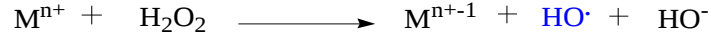
1.6.3. Glikooksidasyon Reaksiyonları

“Glikooksidasyon ürünleri” terimi ilk olarak ardışık glikasyon reaksiyonları tarafından oluşturulan ürünleri karakterize etmek için kullanıldı, bununla birlikte yaygın olarak amadori ürünlerinin otooksidasyonunu tanımlamak için de kullanılır (Thorpe ve Baynes 2003). Glikoz, açık zincir formunda bulunan bir serbest karbonil grubu vasıtasıyla oksidasyon reaksiyonlarına katılabilir. Reaksiyon ortamı oksijen içeriyorsa, glikoz peroksi gibi radikalleri, aktif oksijen bileşiklerini üretme ve oto-oksidize etme yeteneğine sahiptir. Bu radikaller, proteinler arasında kovalent köprüler oluşturarak proteinlerin işlevlerini değiştirebilirler. Sonuç olarak glikasyondan türemiş serbest radikallerin, diyabetik komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynadığına inanılmaktadır (Giaccio ve Brownlee 2010).

İnsan vücudunda, bağlanmamış metal iyonları glikooksidasyonu ve AGE oluşumunu kolaylaştırır. Bu işlem sırasında, hidroksil radikalleri anahtar bir ara üründür. Bu tür radikal, lipid peroksidasyonu ile meta ve orto-tirozin oluşumuna katılır (Şekil 1.8.). Bu her iki tirozin ara ürünü doğal olmayan ve sadece hidroksil radikali varlığında oluşur (Huggins ve ark.1993). Bu radikaller hidrojen peroksitten Cu⁺ veya Fe⁺² (Mⁿ⁺), gibi aktif metal iyonları varlığında üretilir (Şekil 1.9.).



Şekil 1.8. Hidroksil radikalının glikooksidasyonu



Şekil 1.9. Hidroksil radikali oluşumu

1.7. Glikasyonu Etkileyen Faktörler

Protein glikasyonunun diyabetik komplikasyonlara ve yaşa bağlı çeşitli durumlara yol açtığı tespit edilmiştir (Brownlee 2000). Bu nedenle, bu reaksiyonu etkileyen faktörlere büyük bir dikkat gösterilmelidir. Proteinlerin amino grupları ile indirgeyici şekerlerin karbonil grubu arasındaki başlangıçtaki nükleofilik saldırının kinetiği sonuçta pH, oksijen, metal iyonlarına ve şekerin karbonil karbonunun elektrofilitesine bağlıdır (Bunn ve Higgins 1981). Lizin gruplarının sadece küçük bir yüzdesinin glikasyon reaksiyonlarına girdiği ileri sürülmüştür. Bu bölgedeki düşük pKa, bu proteinin başlangıçtaki glikasyonunu kolaylaştırır (Lin ve ark.1998). Dahası, Amadori yeniden düzenlenmesi reaksiyon ortamında mevcut olan fosfat gibi negatif yüklü iyonların ve karboksilat grupları, komşu histidin grupları tarafından etkilenir. Bütün bu faktörler, oluşan Amadori ürünlerinin kimyasal dönüşümlerini artırır (Venkatraman ve ark. 2001).

In vivo glike proteinlerin oluşumunun, spesifik amino gruplarının doğal tepkilerinin, protein yarı ömrü ve hipergliseminin derecesi ve süresine bağlı olduğu bulunmuştur (Ahmed 2005, Wautier ve Schmidt 2004).

1.8. Protein Katlanmasının Dikarboniller ile İlişkisi

MG'ın kimyasal katılma ürünlerinin oluşmasının ve çapraz bağlanmasının proteinlerde yapısal modifikasyon ve agregasyona sebep olduğu bilinmektedir (Monnier ve ark. 1996, Biswas ve ark. 2008). Ökaryotik hücrelerde, proteazom muhtemelen fonksiyonel olmayan toksik proteinlerin birikmesini önlemeye katkı sağlar. Bu

proteolitik sistem, ısı şoku, glikasyon ve oksidatif stres gibi zor şartlara karşı hücreyi korumada özel öneme sahiptir ve ökaryotik hücrelerde protein kalite kontrolünde önemli bir oyuncudur (Goldberg 2003). Fakat eski (kullanılmayan) proteinlerin üretimi onları degrade (ayırıştırma) edecek hücrenin kapasitesini aştığında zamanla çözünmez hale gelir ve muhtemelen hücreler için toksik olan hasar görmüş proteinler artarak birikir. Sonuçta hasar görmüş proteinlerin birikimi normalde agregasyonu önleyen (örneğin Hsc 70 ve Hsc 90) proteolitik sistemler ve moleküler şaperonların yanlış katlanmış ya da hasarlı proteinlerin üretim hızına, yetişememesinden dolayı olur (Frydman 2011, Hartl ve Hayer 2002).

Hsc 70 etkileşim proteinin (CHIP) karboksi ucu UPS ve şaperonlar arasındaki ilişkiden dolayı protein kalite kontrolünde önemli bir rol oynar. Aslında CHIP hem bir tetratrikopeptit tekrar motifi (TPR) hem de U-box domainine sahiptir (Ballinger ve ark.1999). U-box domaini ubiquitin ligaz aktivitesine sahip iken TPR motif Hsp 40, Hsc 70 ve Hsp 90 gibi şaperonlarla bağlantılıdır. Bundan dolayı CHIP ubiquitin eklenerek yanlış ve glikatlanmış veya moleküler şaperonlarla etkileşimleriyle post translasyonel modifiye olan proteinleri kalite kontrollerinde hayati bir öneme sahiptir (Murata ve ark. 2003).

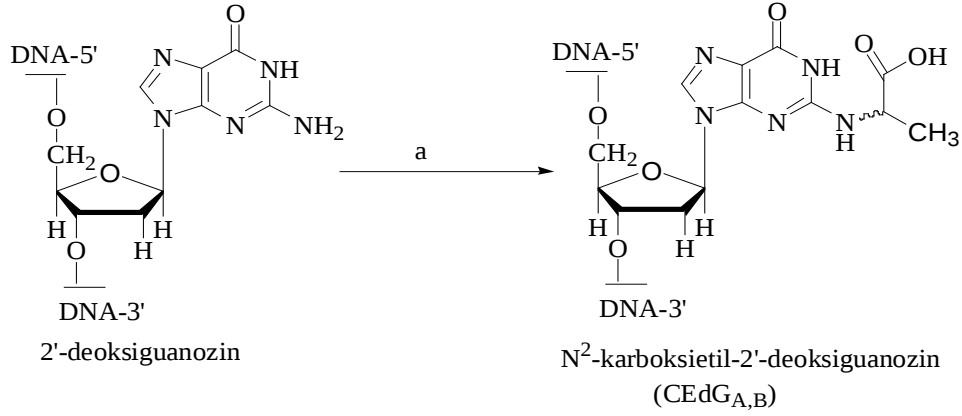
Proteazom aktivitesinin, diyabet ve yaşlanma üzerinde kötü etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir (Portero-Otin ve ark. 2007). Örneğin proteazom aktivator PA28'in seviyesi diyabetik sıçanların kas ekstraktlarında azaltılır ve bu da tipik olarak diyabetik dokularda gözlemlenen, glike ve toksik proteinlerin birikmesine neden olabilir (Merfort ve ark. 2003). Ayrıca genellikle diyabet ve yaşlanmayla bağlantılı olan amiloid agregatların oluşumu MG ve diğer aldehytler tarafından büyük ölçüde arttığı ve bunun da apoptoza sebep olan UPS'yi bozduğu bilinmektedir (Casas ve ark. 2007). Diğer yandan hücre hasarı ve ölümüne katkı sağlayan hücrede modifiye ve toksik proteinlerin birikmesinden de sorumlu olabilen UPS aktivitesininin yaşlanma ile azaldığı ileri sürülmektedir. α -kristalin ve Hsp 27 gibi moleküler şaperonların MGO kaynaklı modifikasyon ve agregasyonun ana hedefleri olduklarını gösteren artan kanıtlarda vardır (Satish ve ark. 2004, Schalkwijk ve ark. 2006). Bu ve diğer birçok kanıtlar yaşlanma ve diyabete bağlı MGO birikiminin muhtemelen protein kalite kontrol mekanizmasının bozulmasına yol açtığına işaret etmektedir. Ancak, UPS'nin işlevinde MGO ve moleküler şaperonların etkileri tam olarak bilinmemektedir.

1.9. DNA'nın Glikasyonu

Nükleik asitler ile yapılan ön çalışmalar, DNA bazlarının amino gruplarının indirgeyici şekerler ile non enzimatik olarak reaksiyon verebildiğini göstermiştir. Nükleik asitlerin ve nükleotidlerin yapılarında bulunan adenin, guanin ve sitozin bazları birer serbest amino grubu içerir ve bu nedenle glikasyon tepkimesine açıktır. DNA'da guanin bazları en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olduğu için glikasyonun başlıca hedefidir. İndirgeyici şekerler ile DNA'nın inkübasyonu ileri glikasyon protein ürünleri ile karşılaştırıldığında benzer spektral özelliklere sahip kromoforlar ve floroforları artırdığı gözlemlenmiştir (Bucala ve ark. 1984, Morita ve Kashimura 1991). DNA'nın şekerler ve şeker degradasyon ürünleri ile proteinlere benzer bir şekilde *in vitro* olarak reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Ochs ve ark. 1994, Knerr ve ark. 1993, Lee ve ark. 1987). Şimdiye kadar izole edilen reaksiyon ürünleri neredeyse sadece N²-karboksi metil-2'-deoksiguanozin veya N²-karboksi etil-2'-deoksiguanozin (CEdG_{A,B}, şekil 1.10.) gibi iki diastomer olan ekzosiklik amino gruplarından alkilenen 2'-deoksiguanozinin katılma ürünleridir (Ochs ve ark. 1994, Knerr ve ark. 1993, Lee ve ark. 1987, Seidel ve Pischetsrieder 1998).

DNA-AGE'lerin genomik bütünlüğün bozulmasına ve dolayısıyla genotoksisiteye sebep olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. DNA glikasyonunun sonuçları örneğin depürinasyon (Seidel ve Pischetsrieder 1998) tek sarmal kırıkları ve mutasyon frekanslarındaki artıştır (Pischetsrieder ve ark. 1999, Bucala ve ark. 1985). DNA glikasyonunun neden olduğu mutasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar ve memeli kromozomal elemanları içeren transpozisyonlardır. Bununla birlikte hücrel sistemlerde ve *in vivo* DNA-AGE'lerin oluşumu hakkında çok az şey bilinmektedir. CEdG_{A,B}'nin, DNA'ya bağlı AGE'ler için iyi belirteçler olduğu kanıtlanmıştır. Çünkü bunlar birçok farklı karbonil prekürsüründen türetilen ve *in vitro* fizyolojik koşullar altında oluşturulan DNA glikasyon ürünleridir (Seidel ve Pischetsrieder 1998, Larisch ve ark. 1997, Frischmann ve ark. 2005).

DNA glikasyonunu *in vitro* olarak izlemek için ELISA'da kullanılan N²-karboksi etil guanine karşı bir poliklonal antikör geliştirilmiştir. Ancak bu test hücrel DNA'yı ve diğer biyolojik numuneleri analiz etmek için yeterince duyarlı değildir.



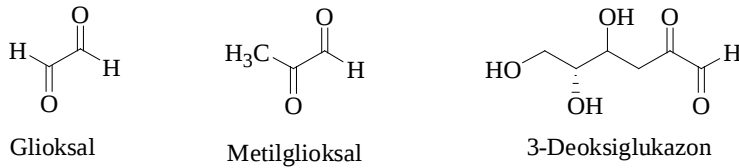
Şekil1.10. Şeker ve şeker degradasyon ürünleri ile DNA'nın reaksiyonundan CedG_{A,B}'nin oluşumu; (a) şeker ve şeker ürünleri (glukoz, fruktoz, MG, GO vb.) ile non enzimatik reaksiyon

1.10. AGE'lerin Karakterizasyonu

Glikasyon reaksiyonu önemli yapısal farklılıklar gösteren bir dizi bileşiğin oluşmasına yol açar. Bununla birlikte bütün AGE'ler floresans özellikleri ve çapraz bağlanmaları temel alınarak dört grupta sınıflandırılabilir (sarımsı-kahverengi floresans renk) (Bousova ve ark. 2005).

1.10.1. Floresans Çapraz Bağlı AGE'ler

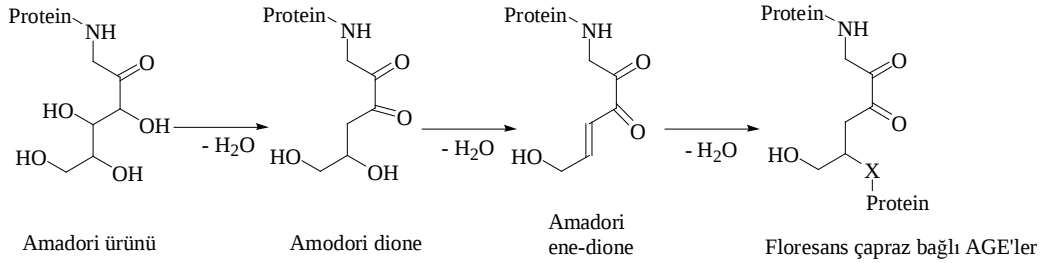
Amino asitlerin veya Amadori ara ürünlerinin bazik grupları ile α -dikarbonilleri içeren bileşikler arasındaki reaksiyonlar, bir dizi çapraz bağlı AGE oluşumuna neden olur (Şekil 1.11).



Şekil 1.1.1. Glikasyon esnasında oluşan α -dikarbonil türevleri

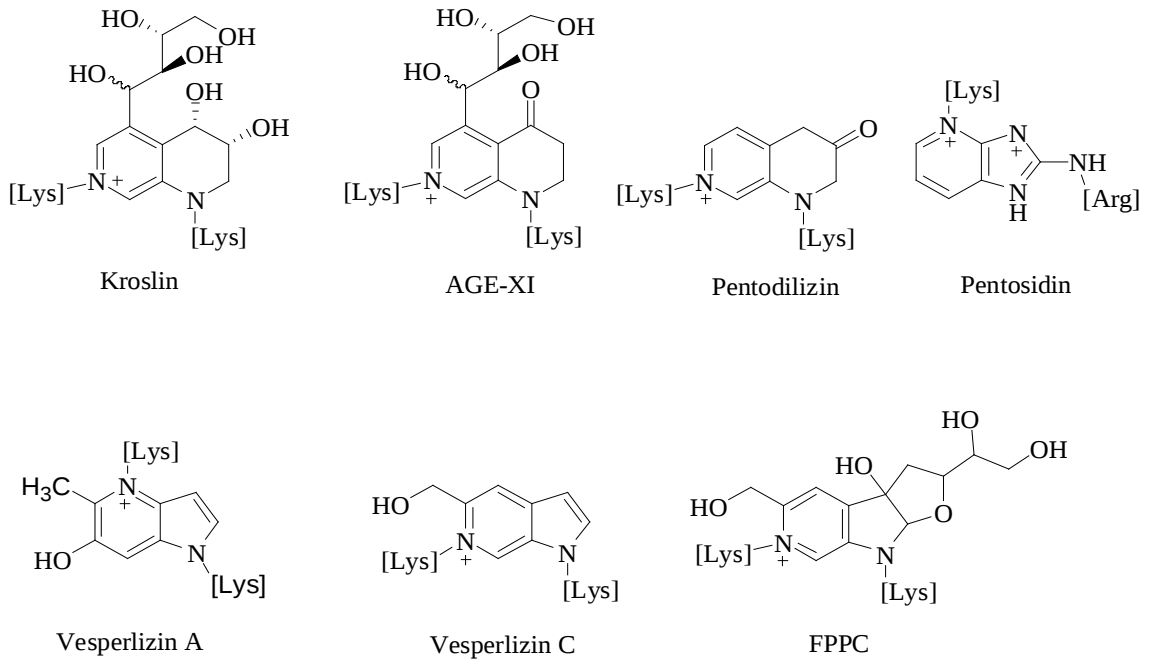
Proteinler arasındaki çapraz bağlanmalar ile oluşan bu yapıların (Şekil 1.11.) diyabet ve yaşlanmayla ilgili süreçte (AGE'lerin) yan etkilerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Floresans ve çapraz bağlanma yapma yetenekleri bu sınıf bileşiklerin en önemli özellikleridir (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. Çapraz bağlı floresans AGE'lerin oluşumu

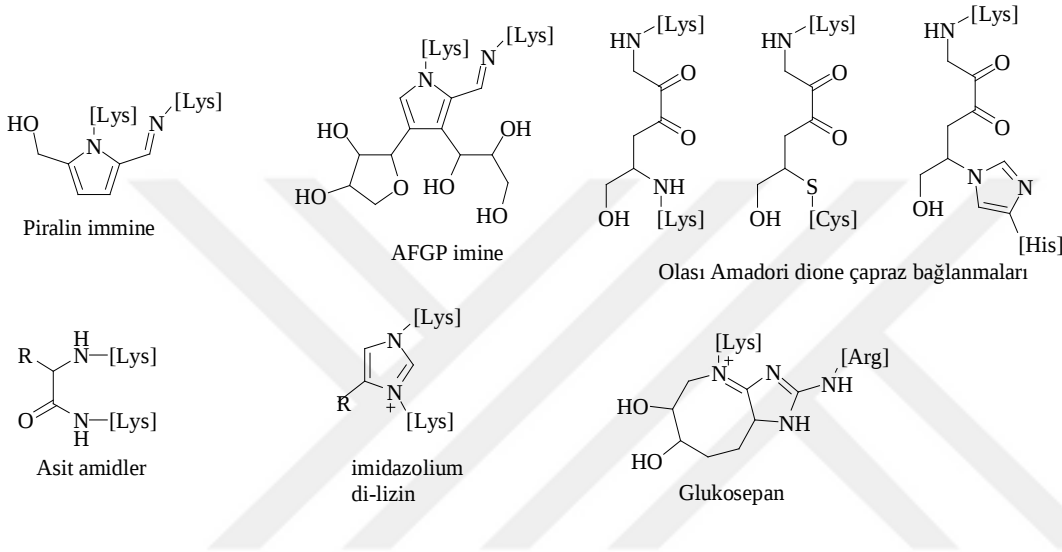
İlk izole edilen ve karakterize edilmiş floresans çapraz bağlı AGE kollojenden elde edilen pentosidindir. Bu bileşiğin sentezi en çok karbonhidratlarla lizin ve arjinin kalıntıları arasındaki reaksiyonla mümkündür (Sell ve ark. 1999). Doğal floresans çapraz bağlı AGE sadece pentosidinle sınırlı değildir. Pentosidinle birlikte başka floresans çapraz bağlı AGE'ler de mevcuttur (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Floresans çapraz bağlı AGE'lere örnekler

1.10.2. Non-Floresans Çapraz Bağlı AGE'ler

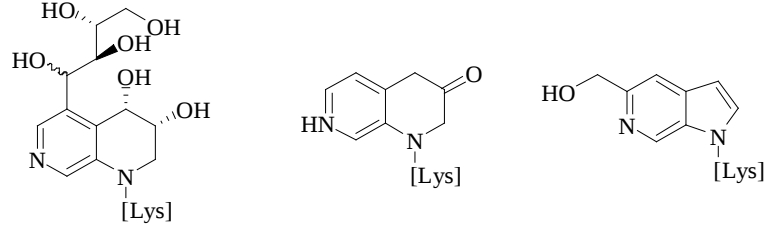
En yüksek orandaki AGE'ler, *in vivo* protein- protein çapraz bağlanmasıyla oluşan floresans olmayan AGE'lerdir. Bu gruba ait olan ana AGE yapıları çapraz bağlı metilglioksal-lizin dimeri (MOLD) veya çapraz bağlı glioksal-lizin dimeri (GOLD) olarak da bilinen imidazolyum di-lizindir (Chellan ve Nagaraj 1999). Non-floresan çapraz bağlı AGE'lerin örnekleri şekil 1.14 de gösterilmektedir.



Şekil 1.14. Non-floresans çapraz bağlı AGE'lere örnekler

1.10.3. Floresans Non-Çapraz Bağlı AGE'ler

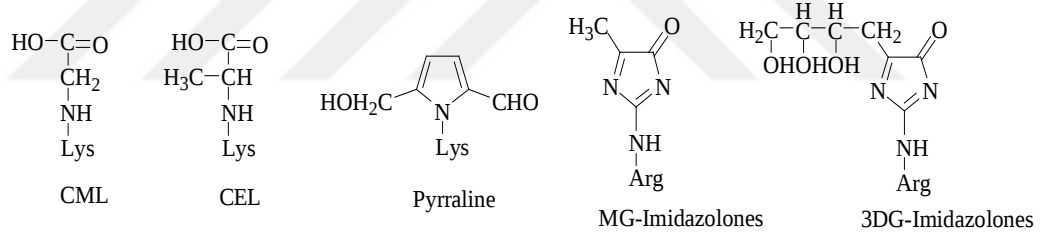
Çapraz bağlı AGE'lere ek olarak, bir dizi floresan non-çapraz bağlı AGE'ler proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını önemli oranda etkileyebildiği diyabetik hastaların kanlarında belirlenmiştir. Bu bileşikler olası protein çapraz bağlanma üzerinde olumsuz etkiye sahip olabilirler. Bunlar doku ve hücresel düzeyde çeşitli istenmeyen değişiklikleri artıran biyolojik reseptörlerin rolünü de oynarlar (Niwa 1999). Organik bağlayıcı fragmentin omurgası floresan çapraz bağlı AGE'lere benzerdir. Heterosiklik kısmı amino asit ile bağlayan bağlardan birinin N-H bağıyla yer değiştirmesi bunun tek istisna olduğu durumdur (Şekil 1.15.).



Şekil 1.15. Floresans non-çapraz bağlı AGE'lere örnekler

1.10.4. Non- Floresan Non-Çapraz Bağlı AGE'ler

Protein glikasyonundan kaynaklanan bir dizi non-floresan non-çapraz bağlı AGE yapıları fizyolojik koşullar altında tanımlanmıştır. Karboksimetil lizin (CML), karboksietil lizin (CEL), pyrraline ve imidazolones bu gruptaki klasik türlerdir (Paul ve ark.1998) (Şekil 1.16.). Sözü edilen AGE'lerin içinde, CML ve Pentosidin *in vivo* özel önem taşımaktadırlar ve yaşam boyunca diyabette AGE birikimi belirteçleri olarak kullanılabilirler (Dyer ve ark.1993, McCance ve ark.1993).



Şekil 1.16. Non-floresan non-çapraz bağlı AGE'lerin örnekleri

1.11. AGE'lerin Eksojen Kaynakları

Kurutulmuş tütün yaprakları *in vivo* AGE konsantrasyonunu oldukça arttıran bir kimyasal kaynak olarak gösterilir. Glikotoksinler kan dolaşımı vasıtasıyla bütün vücuda yayılan ve akciğer hücrelerine nüfuz ettiklerinde alveollere kolayca giren sigaradan kaynaklanır. Glikotoksinler glikasyon ürünleriyle etkileşirler, bundan dolayı genel AGE oluşumuna katkıda bulunurlar (Cerami ve ark.1997). Benzer sonuçlar tütün dumanının iyi bilinen ve önemli bir AGE kaynağı olduğunu vurgulayan başka çalışmalara da dikkat çekmektedir (Peppia ve ark. 2003). Bu yüzden prekürsör AGE'lerin yanma işlemi insan vücudunda reaktif AGE'ler ve toksik oluşumlara sebep olan sigara dumanına dayandırılır. Sonuç olarak AGE konsantrasyonunun sigara içenlerin kanında önemli

ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte sigara kullanan diyabetlilerin arter ve göz merceklerinde daha yüksek AGE konsantrasyonu olduğu açıkça gösterilmiştir (Peppia ve ark. 2003).

Isıtma işlemi dünya çapında gıda işleme, tadı artırma, biyoyararlanım ve güvenlik için kullanılır. Bir dizi olumlu etkilerinin yanında, gıdaları aşırı ısıtma bozucu, istenmeyen reaksiyonların yanı sıra proteinde degradasyonla sonuçlanabilir (Faist ve Erbersdobler 2001, Jaeger ve ark. 2010). Bazı durumlarda ısıtma işlemi Maillard reaksiyonunun oluşmasına uygun ortam hazırlar, bu yüzden gıda ürünlerine istenilen aromalar, renkler ve tatlar eklenir. Özellikle bu reaksiyon pişmiş ekmek, kavrulmuş kahve ve karamel üretiminde yaygın olarak kullanılır. Bunlara ek olarak bir dizi Maillard reaksiyon ürünleri meyve suları, sodalar ve diğer endüstriyel ürünlere de ilave edilir (O'Brien ve Morrissey 1990, Luevano-Contreras ve Chapman-Novakofski 2010).

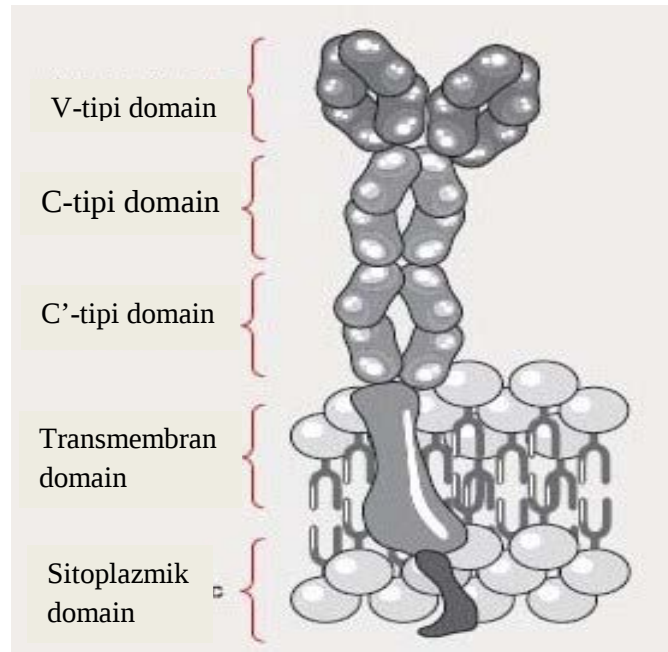
Ne yazık ki, yaygın batı diyeti eksojen AGE kaynaklarını artırmaktadır (Richard ve ark. 2010). Gıda ürünlerinde bu bileşiklerin toplam içeriği besin bileşimlerine bağlıdır. Bu yüzden yağ açısından zengin gıdalar ve proteinler daha yüksek AGE içeriklerine sahiptirler (Goldberg ve ark. 2004, Uribari ve ark. 2010). AGE oluşumu yüksek sıcaklığa maruz kalma derecesini ve süreyi artırmayla hızlandırılır. Ek olarak enzim ilintili immün test (ELISA) kullanılarak vücut içinde dolaşan ve kana giren sindirilmiş AGE'lerin hemen hemen % 10'u tespit edilir. Bu miktarın üçte ikisi doku ve organlarda kalır. Kalan üçte biri böbrekler aracılığıyla vücuttan atılır (Koschinsky ve ark. 1997).

In vivo sentezler ve gıdalarla insan vücuduna giren Maillard reaksiyon ürünlerinin çoğu karakterize edilmeden kalır. Bununla beraber bu bileşiklerin bazıları dikarbonil türevlerinin yanı sıra piralin ve furfural türevleridir (Ames 2008). CML (N-epsilon-carboxymethyl-lysine) bu AGE çeşitliliğine bakılmaksızın tespit edilen ve en bol bulunan AGE'dir. Gıda analitik araştırmalarında CML her zaman ilk belirlenen AGE miktarıdır. Bu bileşik özellikle sütte ve süt içeren ürünlerde bol miktarda bulunur. Bu yüzden CML gıdalarda AGE biyobelirteci olarak seçilmiştir (Ames 2008).

AGE'lerin *in vivo* oluşup oluşmadığına bakılmaksızın veya gıdalar ve tütün dumanı ile vücuda girerler, biyolojik özelliklerini, ileri glikasyon son ürünleri reseptörleri (RAGE) ile etkileşim yolu ile ifade ederler.

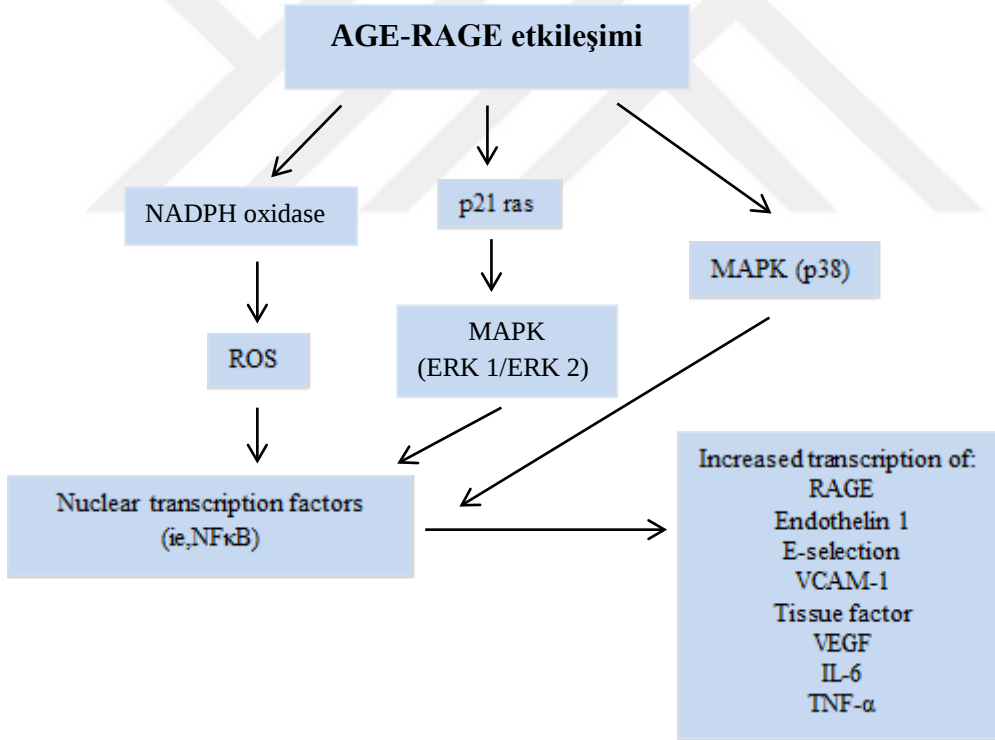
1.12. AGE'lerin Biyolojik Etkileri (reseptöre bağlı etkiler)

RAGE, reseptörlerin immünoglobulin grubuna ait bir bileşiktir. İnsanlarda RAGE'nin sentezlenmesinden sorumlu gen histokompatibilite kompleks genlerinin sınıf II ve III'ü arasında bulunan altıncı kromozom üzerinde bulunur. Gen 11 ekzondan oluşur ve bu genin tipik varvasyonları tanımlanmıştır (Hudson ve Schmidt 2004). Tipik bir RAGE molekülünün kütlesi 45 kDa'dır. Bu molekülün önemli bir kısmı hücresel duvarda bulunur; bulunla birlikte, bir hücre dışı elemanı da mevcuttur. Bir RAGE molekülünün hücre dışı kısmı değişken (V-tipi) alandan oluşur ve bunu iki sabit (C-tipi) alan izler. V-tipi alan, immünoglobulin içinde bulunana benzerdir. RAGE, membranın bir tarafından diğerine uzanan tek bir alana sahiptir. V-tipi alanın organik ligandlara bağlanmada çok önemli olduğu kanıtlanmıştır ve sabit alanlı sitozolik kuyruk RAGE aracılı sinyalleşme için çok önemlidir (Srikanth ve ark. 2011). Normal RAGE molekül tam uzunluğuna ek olarak, bir dizi kesilmiş varvasyon bulunur. Bu varvasyonların varlığı, mitokondrial RNA'daki ekleme varyantlarının varlığı ile açıklanmaktadır. Örneğin, N-kesikli protein tipi V-tipi segmente sahip değildir, ancak diğer tüm özelliklerinde normal RAGE proteinlerine benzerdir ve hücre membranından devre dışı bırakılmıştır (Basta 2008) (Şekil 1.17.).



Şekil 1.17. RAGE şematik gösterimi

RAGE molekülleri bir dizi organ ve dokularda bulunur, ancak en yüksek konsantrasyonları iskelet kasları, akciğerler ve kalptedir. Ayrıca bu tür protein lenfositlerde ve makrofajlarda da bulunabilir (Koyama ve ark. 2007). AGE reseptörleri diyabet komplikasyonlarının gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Win ve ark. 2012). Bu sonuç, deneysel modeller üzerinde araştırmalarla desteklenmiştir. Örneğin RAGE aktivasyonunun merkezi sinir sisteminin gelişmesi ile beraber aksonal filizlenmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Öte yandan RAGE inhibisyonu siyatik sinir fonksiyonlarının depresyonuna ve rejenerasyonuna yol açar (Huttunen ve ark. 2000). AGE-RAGE etkileşiminin en önemli sonucu, oksidatif stres ile sonuçlanan bir dizi biyolojik mekanizmanın harekete geçirilmesidir. AGE-RAGE etkileşiminin biyolojik sonuçları şekil 1.18 gösterilmiştir.



Şekil 1.18. AGE-RAGE etkileşiminin biyolojik etkileri

İlgili etkileşimler, pro-inflamatuar kemokin ve sitokin ekspresyonunun doğrudan bir sonucu olarak uzun süreli inflamasyonun artmasına yol açar (Şekil 1.18.). Her iki

bileşimin ekspresyonu RAGE'ye bağlıdır. AGE-RAGE etkileşimin ilk biyolojik etkisi, reaktif oksijen türlerini (ROT) artırmasıdır. ROT oluşumunun ilk safhası, NAD(P)H oksidaz sistemi tarafından etkilenir.

Yakın tarihli bir araştırmada, RAGE oluşumundan sorumlu amino asit dizilimindeki değişiklikler, hücrede molekül tarafından iletilen sinyalin değişmesine neden olduğu gösterilmiştir. Dahası sinyalin süresi ve yoğunluğu RAGE'ler tarafından kullanılan farklı sinyal yollarından kaynaklanır. Bu yollar ve buna karşılık gen sonuçlar şekil 1. 18'de gösterilmiştir (Marchetti 2009).

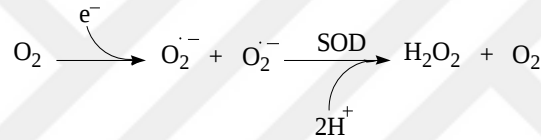
Hem AGE metabolizması hem de RAGE ile etkileşim ROT üretimi ile sonuçlanır. Bu türler oksidatif stres ve daha çok diyabetik komplikasyonların artmasında büyük öneme sahiptir.

1.13. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksidatif stres hücrel makromoleküllerde olası oksidatif hasar ile sonuçlanan oksidan ve antioksidan dengesindeki bozukluk ile ilgilidir. Çoğu hücreler oksidatif hasarlı molekülleri tanıyan ve ortadan kaldıran antioksidan savunma kapasitesine ve onarım sistemlerine sahip olduğundan dolayı oksidatif stresi hafif derecede tolere edebilirler. Oksidan ve antioksidan dengesizliği ya üretim ve dağıtımda aksamaya sebep olan antioksidan kapasite eksikliği ya da başka faktörlerden üretilen aşırı seviyede ROT'lardan kaynaklanabilir (Ha ve ark. 2010). Reaktif oksijen türlerinin yağlı karaciğerde mevcut bazı tipik türlerinin örnekleri süperoksit anyonları ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikalleri ($\cdot OH$)'ni kapsayan prooksidan kimyasalların toplu bir terimidir (Browning ve Horton 2004).

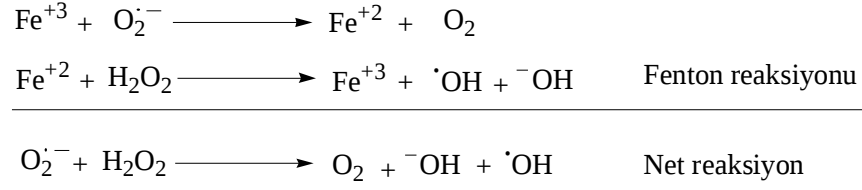
Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizmasının doğal yan ürünleri olarak üretilir. Reaktif oksijen türleri yabancı bakteri ve patojenleri öldürmek için aktive edilen nötrofillerde NADPH oksidaz tarafından üretilirler. Ayrıca hücrel fonksiyonlar için hepsi hayati olan hücre göçü, gen ekspresyonu ve hücre büyümesine doğru hücrel sinyalizasyonu sağlarlar (Halliwell 2009). Hayati rollerine rağmen, aşırı ROT nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanseri de kapsayan birçok hastalığın patogeneziyle bağlantılandırılan oksidatif stresle sonuçlanabilir (Nishikawa ve ark. 2010, Halliwell 2009).

Ökaryotik hücreler enerji üretimini sağlamak için oksijeni kullanırlar. Oksijen bir elektron indirgemesine maruz kaldığında süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) üretilir. Süperoksit anyonu ksantin oksidaz veya indirgenmiş NOX tarafından üretilmesine rağmen süperoksit üretiminin ana alanı kompleks I ve kompleks III de elektron taşıma zincirinden elektron sızıntısıyla mitokondridedir (Turrens 1997, Brozmanova ve ark. 2001). Aerobik metabolizmada oksijenin toplam tüketiminin yaklaşık % 1-2'si süperoksit anyonu üretimine sebep olur. Süperoksit anyonu ROT üretmek için başka moleküllerle ya doğrudan ya enzimle ya da metal katalizli işlemlerle tepkime gerçekleştirir. Örneğin, süperoksit anyonları hızlı bir şekilde nitrik oksit radikalleriyle tepkimeye girer ve non enzimatik olarak güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturur (Pacher ve ark. 2007). Süperoksit enzimatik olarak süperoksit dismutaz tarafından H_2O_2 ve H_2O 'ya dönüştürülerek detoksifiye edilir (Steinbeck ve ark. 1993). (Şekil 1.19.).



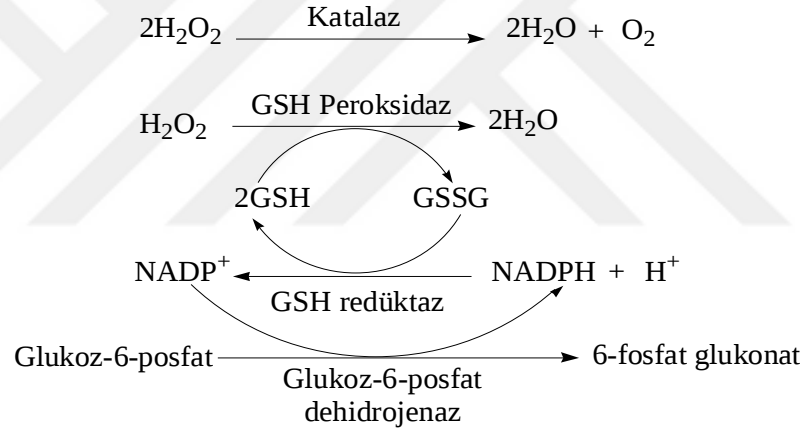
Şekil 1.19. Moleküler oksijenin süperoksit dismutaz tarafından hidrojen peroksit ve suya indirgenmesi

Yağ asidi, D-amino asit ve pürinler gibi çeşitli substratların metabolizmasında yer alan hidrojen peroksit peroksizomda çeşitli oksidazlar tarafından üretilir (Boveris ve ark. 1972, Angermuller ve ark. 2009). Hidrojen peroksit proteinin tiyol gruplarını okside edebilir ve Fenton reaksiyonu geçirir (Halliwell ve Gutteridge 1992). Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi geçiş metalleri hücresel enzimatik ve protein fonksiyonlarını devam ettirmede hayati rollere sahiptirler. Demir ferritine bağlanarak regüle edilir ve fazlası karaciğerde depolanır. Geçiş metalleri varlığında H_2O_2 'in oldukça reaktif hidroksil radikali ($\cdot OH$) ürettiği Haber-Wiss reaksiyonu (Fenton reaksiyonu) katalizlenir (Chance ve ark. 1973) (Şekil 1.20.). Hidroksil radikalleri lipid peroksidasyonu, değişmiş protein ve DNA nükleotitleri ve oksidatif DNA hasarına sebep olduğundan dolayı en güçlü ROT radikali olduğu öne sürülmüştür (Breen ve Murphy 1995, Valko ve ark. 2006). Son derece reaktif radikaldir ve yarılanma ömrü 10^{-9} saniye olup oldukça kısadır. Diğer oksidanlardan farklı olarak hidroksil radikali enzimler tarafından doğrudan detoksifiye edilemez.



Şekil 1.20. Haber Weiss reaksiyonu

Hücreler ROT'un oksidatif hasarını önlemek için birkaç antioksidan savunma geliştirmeye evrimleşmiştir. Çoğu oksidanlar enzimatik olarak detoksifiye edilebilir. Süperoksit anyonu ya peroksizomal katalaz ya da glutatyon peroksidaz (GP) tarafından daha fazla detoksifiye edilebilen H_2O_2 'i oluşturmak için SOD tarafından detoksifikasyona uğrar (Tappel ve ark. 1982) (Şekil 1.21.).



Şekil 1.21. Peroksizomal katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından hidrojen peroksit detoksifikasyonu.

ROT üretimi normalde antioksidan savunmaları ile dengelenir. Ancak ROT üretimi belli hastalık koşullarında artabilir ve oksidatif strese sebep olur. Diyetle alınan fruktoz iltihaplı kaskadları harekete geçiren enflamasyonlu sitokinlerin üretimini artırdığı için enflamasyona sebep olduğu gösterildi (Le ve Tappy 2006, Rayssiguier ve ark. 2006). Aktive inflamatuvar kaskadlar gen ekspresyonunun değişimine sebep olan Nükleer faktör kappa B (NF-kB) gibi transkripsiyonal faktörlerin üretimini artırır (Roglans ve ark. 2007, Morgan ve Liu 2011). Değiştirilmiş gen ekspresyonu ve sitokin üretiminin artması ROT üretimini artırabilir (Morgan ve Liu 2011). Kronik hiperglisemi

ya reaktif dikarbonil mitokondrial hasar ya da RAGE ve AGE arasındaki etkileşim ile ROT üretimini de değiştirebilir (Turrens 1997).

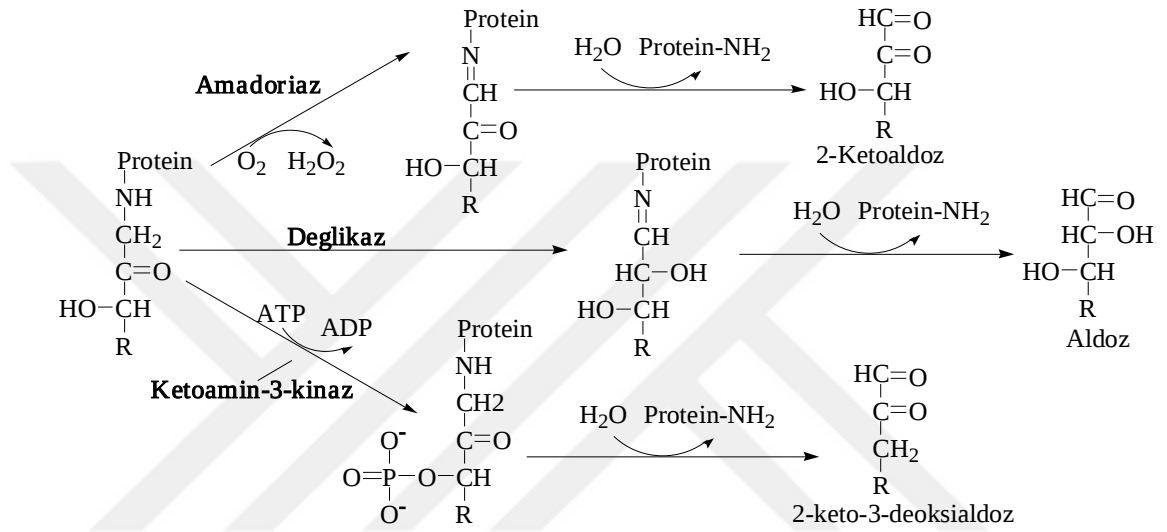
İndirgenmiş şekerlerden oluşan reaktif dikarboniller (MG ve GO) mitokondrial solunumu engeller ve böylece ROT'ı artırır (Rosca ve ark. 2005). Bu dikarboniller protein yapılarını değiştirebilir ve protein malfonksiyonuna sebep olabilir. MG-modifiye proteinler oksidatif fosforilasyon, solunum zinciri ve yağ asidi oksidasyonuna dahil olurlar. Dahası bu proteinlerin ikisi süperoksit anyonlarının başlıca üretim bölgesi elektron taşıma zincirinin Kompleks III tamamlayıcısıdır (Rosca ve ark. 2005). İndirgeyici şekerler ve metabolitleri RAGE'lerle etkileşebilen AGE'leri de oluşturabilir. Bu etkileşim NOX ve inflamatuvar sitokinleriyle artmış ROT üretimiyle sonuçlanır (Wautier ve ark. 2001, Yan ve ark. 2010).

Oksidatif stres koşullarında, oksidanlar enzimler tarafından kullanılan kofaktörleri tüketebildiğinden dolayı kimyasal reaksiyonlar engellenebilir. Örneğin glioksalaz I MG için en önemli detoksifikasyon enzimi olarak gösterilir ve bu reaksiyon kofaktör olarak GSH kullanır (Yang ve ark. 2011). Ancak GSH oksidatif stres koşullarında tüketilir. Böylece ROT doğrudan biyomoleküllere saldırarak hücrel fonksiyonların bozulmasına sebep olabilir (Morgan ve Liu 2011). ROT'lar lipidler, proteinler ve nükleik asitlere saldırabilir ve oksidatif hasara sebep olabilir. Artmış hücrel ROT seviyesi çeşitli reaksiyonları katalize edebildiği için endojen toksinlerin üretimini de artırabilir.

1.14. Glikasyona Karşı Doğal Savunma Mekanizmaları

Yakın zamana kadar makromoleküllerin onarımının sadece DNA'ya özgü olduğu kabul edilmekteydi. Yeni bilgiler, kimyasal olarak değişime uğrayan proteinlerin de çeşitli mekanizmalarla tamir edilebildiğini göstermektedir. İnsan vücudu, glikasyona ve AGE'lerin birikimine karşı vücudu korumak için çeşitli hücrel mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar reaktif dikarbonil bileşiklerini detoksifiye etmek ve AGE oluşumunu azaltmak için glioksalaz sistemleri (I ve II), glutasyon ve aldoz redüktazları kullanmaktadır (Gomes ve ark. 2005, Thornalley 1998). Ayrıca, Amadoriazlar adı verilen yeni bir enzim grubu, Amadori ürünlerinin deglikasyonunu katalize eder, böylelikle glikasyona karşı savunurlar (Gerhardinger ve ark.1995, Kousar ve ark. 2012).

İnsan FN3K'nın (Fruktozamin-3-kinaz), glike proteinlerin üzerinde yer alan fruktozlizin gruplarını fosforile ettiği ve onu fruktozlizin-3-fosfat haline dönüştürdüğü gösterilmiştir (Şekil 1.22). Bu bileşik spontan olarak parçalanır, böylece glikasyon reaksiyonu erken evrede tersine çevrilir (Lapolla ve ark 2013, Szwergold ve ark. 2001). Ayrıca makrofajlar reseptörlere sahiptir ve bu da endositoz ile glike proteinleri tanıma ve uzaklaştırmalarına olanak sağlar (Matsumoto ve ark. 2002, Vlassara ve ark.1988).



Şekil 1.22. Glikasyona uğramış proteinlerin enzimatik onarımı (deglikasyonu)

1.15. AGE Ölçüm Yöntemleri

Diyabetik hastalarda metabolik kontrolü değerlendirmek için amadori ürünleri kullanılmaktadır ve en yaygın kullanılan parametrelerden birisi glikolize hemoglobin (HbA1c) düzeylerinin tespiti. HbA1c düzeyleri glukozla maruz kalan son son 4-8 haftalık dönemde gerçekleşen glikasyonu temsil etmektedir ve glikoz düzeyi ile doğrusal bir bağıntı göstermektedir.

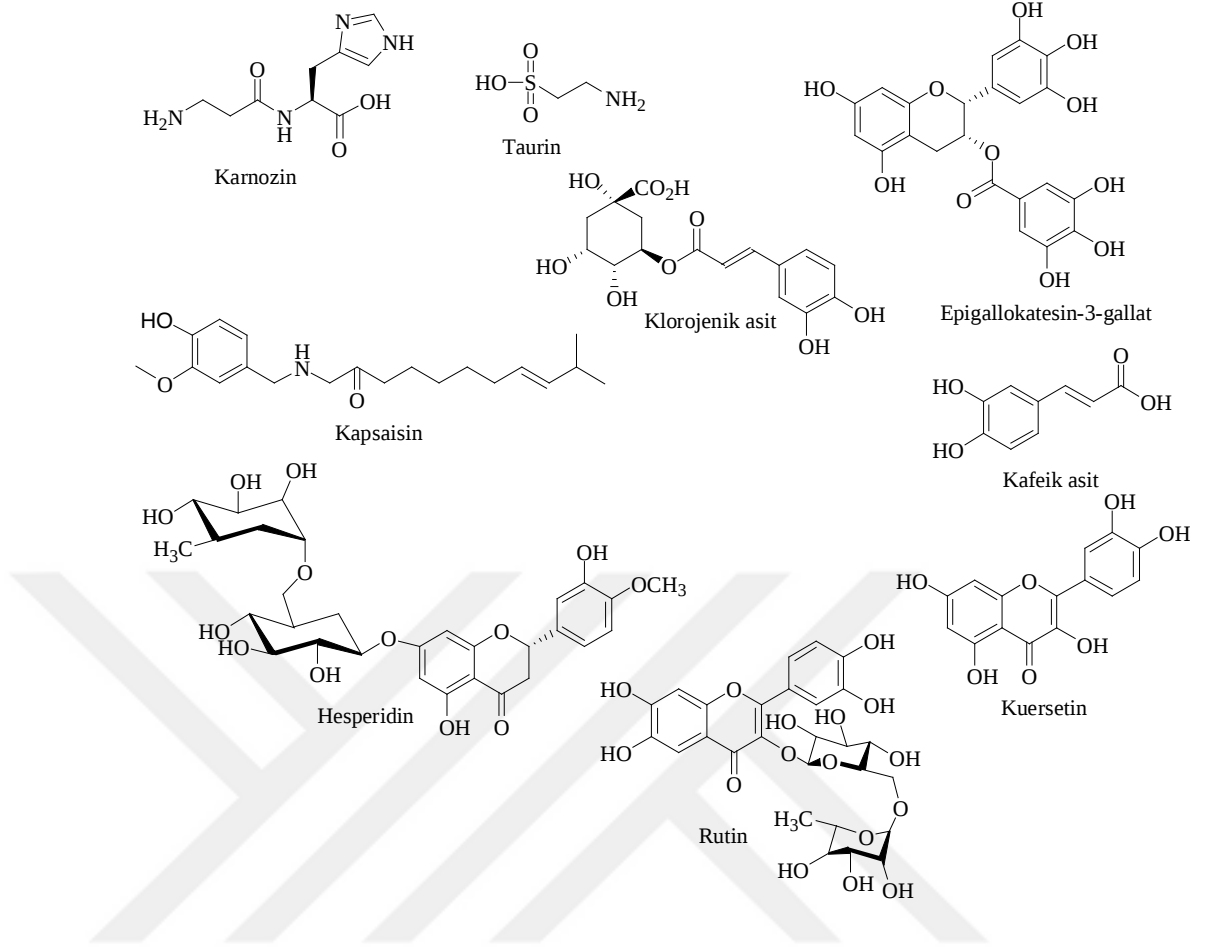
Yaş ve diyabet gibi belirli patolojik durumlarda biriken AGE'ler için deneysel kanıtlar olmasına rağmen laboratuvarlar arasında sonuçları kıyaslamak zordur. Şimdiye kadar AGE ölçümü araştırma laboratuvarlarıyla sınırlı kalmıştır. Şimdilerde ne yaygın olarak kabul gören veya genellikle AGE tespit etmek için kullanılan ne de ticari olarak kullanılan bir kit yoktur. Evrensel olarak kullanılan bir ölçü birimi/aleti olmamasına

rağmen son zamanlarda farklı laboratuvarların sonuçlarının kıyaslanması için evrensel bir ölçü biriminin benimsenmesi önerilmiştir (Mitsuhashi ve ark. 1997). İç standart eksikliği her bir örneğin denenmesi için tekrarlanabilirlik ve yüksek doğruluk derecesi gerektiren testleri hataya açık bırakır. Şimdilerde AGE'leri tespit etmek için kullanılan yöntemler yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), enzim-bağlantılı immunosorbent (ELISA) ve immunohistokimya'dır (Munch ve ark.1997, Papanastasiou ve ark. 1994). Son zamanlarda 6D12 olarak adlandırılan CML olarak bilinen monoklonal antibody ticari olarak satılmaktadır (Ikeda ve ark. 1996).

1.16. Doğal Glikasyon İnhibitörleri

Birçok farklı bileşik şu anda *in vivo* analiz ve kapsamlı bir çalışma altında olduğu halde çok azı başarıyla klinik denemelere girmiştir. Ancak, bu bileşiklerin hiçbiri şimdiye kadar klinik kullanım için onay alamamıştır. Son dönemlerde yapılan birkaç çalışma antiglikasyon ve antioksidan besinlerle birleştirilmiş gıda takviyesinin hedef diyabetik komplikasyonlar ve bunları önlemeyi amaçlayan geleneksel tedavi için güvenli ve tamamlayıcı olabileceğini belirtmiştir (Ahmet ve ark. 2007, Babu ve ark. 2006). Örneğin; *Thymus vulgaris*'den elde edilen crisilineol (Morimitsu ve ark. 1995), Luobuma çayı (Yokozawa ve Nakagawa 2004) ve *Garcinia indica* meyvesinden elde edilen garcinol'ü (Yamaguchi ve ark. 2000) kapsayan polifenol bileşikler AGE oluşumunun güçlü inhibitörleri olabileceğini göstermiştir. Bunlara ek olarak domates salçasından elde edilen rutin etken maddesinin oto oksidasyonu ve glikasyonu inhibe ettiği bulunmuştur (Kiho ve ark. 2004). Dahası bir takım antioksidan besinlerin *in vitro* antiglikasyon özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir.

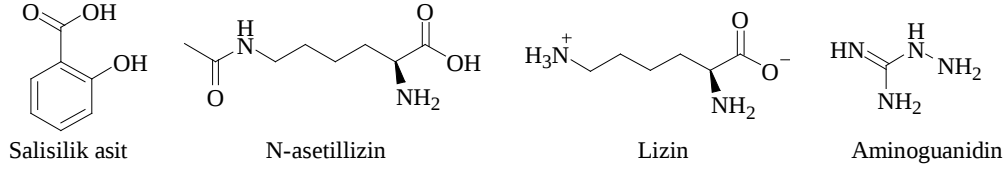
Örneğin, yeşil çay özütü AGE oluşumunu inhibe edebileceği tespit edilen büyük miktarlarda tannin (flavonoid) içerir (Babu ve ark. 2007). Ek olarak bir dizi başka AGE inhibitörleri doğal kaynaklardan elde edilmiştir. Bu bileşikler yeşil çay ve kahve çekirdeklerinden yaygın olarak elde edilen epigallocatekin-3-gallat, klorojenik asit ve caffeic asidi kapsar. Doğal inhibitörlerin örnekleri capsaicin, hesperidin ve quercetini de kapsar (Popova ve ark. 2010).



Şekil 1.23. Doğal olarak oluşan glikasyon inhibitörleri

Bu bileşikler doğada bulunan tek inhibitörler değildir. Tarih boyunca salisilat temelli tedavi diyabetik hastalarda ortaya çıkan glukozuriyi düşüren olumlu etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Dahası N-asetilizin ve lizin diyabet sırasında oluşan albümin üri düşürmede faydalı olduğu ortaya çıkmıştır. Yine de *in vivo* ve *in vitro* deneylerde yoğun olarak çalışılan Aminoguanidindir. Başlangıçta AG kollojen aortu çapraz bağlama ve floresansı inhibe edecek yeteneğe sahip olduğu saptanmıştır. Daha sonra bu bileşik vaskülopati nöropati ve nefropatiyi kapsayan bir dizi diyabetik komplikasyonları önleyebileceğini gösterilmiştir (Thornalley 2003). Bu bileşik hiperglisemiye etkilemediği fakat glikasyonda üretilen reaktif ara ürünleri deaktif edebildi. Bu yüzden inhibitör özellikleri gösterir (Thornalley ve ark. 1999). Mükemmel bir AGE inhibitörü olmasına ek olarak AG nitrik oksit radikalleri gibi ROT'ları deaktif edebileceği de bulundu. Yine de AG yüksek olasılıklı anti nükleer antibadi (ANF) geliştirme ve

anemiye kapsayan bir dizi yan etkilere sahiptir. Aminoguanidinle tedavi edilen diyabetik hastalarda daha yüksek oranda renal neoplastik ve pankreatik tümörler tespit edildi. Sonuç olarak komplikasyonlar aminoguanidin tedavisini zorunlu kesme bu bileşik ile ilişkilidir (Rahbar ve Figarola 2003). Doğal glikasyon inhibitörlerle birlikte bir dizi sentetik benzerleri geliştirildi.



Şekil 1.24. Sentetik glikasyon inhibitörleri

Dahası, bir Rus bilim adamı olan Vladimir Gulevich tarafından dipeptit karnozin keşfedildi. Beyin dokusunda ve hayvan kaslarında bulundu. Birkaç çalışma karnozininin antiglikasyon ajan etkilerine sahip olabileceğini göstermiştir (Hipkiss ve ark. 1995, Hobart ve ark. 2004, Argirova ve Argirov 2003). Bu dipeptit indirgen şekerlerle malondialdehit ve metilglioksal gibi diğer reaktif aldehytlerin sebep olduğu çapraz bağlama ve protein karbonil oluşumunu inhibe edebileceğini göstermiştir (Hipkiss 2005).

1.17. Anti-MG ve Anti-AGE Bileşikleri

MG ve AGE'lerin zararlı etkilerinin önlenmesinde çeşitli tedavi şekilleri denenmiştir. Anti-MG ve anti-AGE etkileriyle daha yaygın olarak kullanılan bileşikler şunlardır:

Aminoguanidin 100 yıldan fazla bir geçmişe sahiptir. 1982 yılında nitro guanidinin redüksiyonu ile elde edilmiştir. MG söndürücü ve yaygın kullanımlı AGE inhibitörleri içinde popüler olanlardan biridir (Brownlee ve ark.1986). Bir guanidin türeği olmasına rağmen hidrazinlerle birçok benzer özellikleri paylaşır ve bir hidrazin olarak sınıflandırılır (Nilsson 1999). Aminoguanidin çeşitli metabolik aşamalarda oluşmuş reaktif dikarbonilleri söndürmekle birlikte glukozun karbonil grubuyla birleşerek AGE oluşumunu önler (Edelstein ve Brownlee 1992). Aminoguanidinin inhibe edici etkisi esas olarak amadori aşamasındadır (Khalifah ve ark 1999). Erken

glukasyon ürünlerinin oluşumunu ise engellemez. Aminoguanidin sadece spesifik bir AGE inhibitörü değildir, başka etkilere de sahiptir (Nilsson 1999).

Biyolojik diaminler olan putresin ve histaminin oksidatif deaminasyonunu katalizleyen diamin oksidazı inhibe eder (Schuler 1952).

Aminoguanidin nitrik oksit sentetazı (NOS) inhibe eder ve vücutta L-arjininden bir dinamik denge sinyalleşme molekülü olan nitrik oksit (NO) oluşumunu önler (Moncada ve ark. 1991).

Aminoguanidin S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz enzimine de bağlanır ve ornitinden spermin ve spermidin gibi poliaminlerin sentezini artırır (Moncada ve ark. 1991).

Aminoguanidin pridoksala da bağlanabilir ve bu B₆ vitamin eksikliğine sebep olur bu da aminoguanidinin yan etkisidir (Miyata ve van Ypersele de Strihou 2003).

Biguanid grubu ilaç olan metformin 1922 yılında *Galega officinalis* (keçisedefi bitkisi) adındaki bitki ekstresinden sentez edilmiştir. Metformin post-Amadori aşamasındaki etkileriyle AGE oluşumunu inhibe edebilen oral dimetilbiguanidin antihiperglisemik bir maddedir (Rahbar ve Figarola 2003). Metforminin MG söndürme etkisi inaktif ürün oluşturma amaçlı olarak MG'a bağlanan metforminin guanidino grubundan dolayı olduğu ileri sürülüyor.

Bir thiazolidinedione olan pioglitazon, bir insülin sensizitörü olarak görev yapan ve tip 2 diyabetlilerde kullanılan bir peroksizom poliferatör-aktive reseptör gama (PPAR γ) agonistidir. Pioglitazon'un glukasyon, AGE oluşumu, ve proteinin çapraz bağlanmasını inhibe ederek anti-AGE etkisi olduğu öne sürülmüştür (Hirasawa ve ark. 2008). Bir anti-MG veya anti-AGE bileşiği olarak pioglitazon kullanılan çalışmalar ilerleyememektedir ve bu bağlamda pioglitazonun terapötik potansiyeli hakkında kesin ifadeler kullanmak için daha fazla kanıta gereksinim vardır.

N-asetilsistein (NAC), MG söndürücü ve antioksidan bir bileşiktir (Vasdev 1998). NAC'i anti-MG bileşiği olarak kullanmak için birçok neden vardır: NAC MG süpürücü ve antioksidan etkileri olan GSH seviyesini artırabilir, NAC sistein içeren bir tiyol bileşiğidir ve MG'a yüksek affinite ile bağlanır (Lauterburg ve ark. 1983). NAC halihazırda klinik olarak, aşırı dozda asetaminofen gibi durumlarda kullanılıyor.

Antihipertansif ilaçların yaygın olarak kullanılan bir sınıfının anti-AGE etkileri olduğu öne sürülmüştür. Anjiyotensin reseptör blokerleri (ARBs) ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEIs) kan basıncını düşürme eyleminden bağımsız olarak böbrek hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir ve bir anti-AGE olarak önerilmiştir (Nangaku ve ark. 2003).

Birkaç bileşiğin sınırlı çalışmalarla anti-AGE etkileri araştırılmıştır, ancak hayvanlarda veya insanlarda deneysel çalışmalarla yaygın olarak kullanılmamıştır. Bu bileşikler siklooksijenaz inhibitörleri, aspirin, ibuprofen, diklorofenak, ksantin türevleri, pentoksifilin, metal şelatörler, D-penisilamin, desferoksamin, tiamin pirofosfat ve piridoksamindir (Stitt ve ark. 2002). Bu bileşiklerin anti-AGE veya anti-MG etkileri hakkında kesin sonuçlar çıkarmak için daha fazla çalışma gerekmektedir.

Özellikle mikroorganizmalarda proteine bağlı şekeri temizleyen birçok deglikasyon enzimi keşfedilmiştir (Monnier 2005). Amadoriazlar olarak bilinen bu enzimler fruktozamin oksidazlar, fruktozamin-3-kinaz, fruktozlizin-6-kinaz, fruktozlizin-3-epimeraz ve glukozlizin-6-fosfat deglikazdır (Wiame ve ark. 2005). Bu enzimlerin kullanılması veya kararlı analoglarının geliştirilmesi deglikasyon tedavisi için spekülasyon kalıyor.

1.18. Bu Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

1. Bu tez çalışmasında *Silybum marianum* tohumunun etanol:su (1:1) ekstaktının öncelikle diyabette belirgin bir şekilde artış gösteren serbest radikalleri söndürme etkisi araştırıldı. Bu amaçla total fenolik ve flavonoid bileşen miktar tayini, indirgeme gücü ve ABTS radikal katyonunu söndürme aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Daha sonra *S. marianum* tohumunun fruktoz ile indüklenen protein glikasyonu ve oksidatif hasar üzerine inhibisyon etkisi bovin serum albumin (BSA) kullanarak araştırıldı. Ayrıca *S. marianum*'un oksidatif DNA hasarını önleme kabiliyetini araştırmak için Fe^{+3} ile birlikte lizin ve MG'den oluşan bir glikasyon model sistemi oluşturularak *S. marianum* tohumunun serbest radikal süpürme aktivitesi üzerine koruyucu etkilerinin gösterilmesi, hem literatüre büyük katkı sağlayacak hemde *S. marianum*'un AGE ile ilişkili hastalıklarda antiglikasyon ajanı olarak, standart tedavi protokollerine eklenmesini gündeme getirebilecektir.

2. AGE inhibitörlerinin keşfi ve araştırılması diyabetin veya diğer patolojik komplikasyonlarının önlenmesinde potansiyel terapötik bir yaklaşımdır. Sentetik bileşikler güçlü AGE inhibitörü olmalarına karşın aynı zamanda yan etkilere de neden olmaktadır. Sentetik bileşiklerle kıyaslandığında doğal bileşiklerin tüketiminin insan sağlığı için daha güvenli olduğu kanıtlanmıştır. Diyabet tedavisi sırasında kullanılan ilaçların aynı zamanda antioksidan etkilerinin olması tedavi başarısını artırdığı ve oksidatif hasara bağlı sekonder hastalık oluşumlarını azalttığı bilinmektedir. Bu amaçla doğal kaynaklardan yeni "anti-AGE" inhibitörlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

3. Bitki ekstraktlarının, fraksiyonlarının ve bileşiklerinin AGE oluşumu üzerine inhibisyon aktiviteleri son yıllarda çalışılmaktadır. Türkiye’de bu alanda yapılan çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmanın hem literatüre hem de ilaç tasarım çalışmalarına önemli yenilikler ve katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nakamura ve ark (2007); pridoksal-5-fosfat (PLP) ve pridoksamin (PM)'nin nefropati üzerine faydalı etkilerinin olup olmadığını araştırmak için streptozosin (STZ) ile diyabet yapılan sıçanlara 16 hafta boyunca 600 mg/kg/günlük olarak PLP ve PM oral olarak vermişler. AGE'leri [imidazolon, Ne-(karboksimetil)lizin (CML) ve N²-2'-deoksiguanozin (CEdG)], transforme edici büyüme faktörü-b1 (TGF-b1), tip 1 kollojen ve fibronektin, böbreklerde immünohistokimya kullanılarak tespit etmişler. Böbreklerdeki AGE'ler için reseptörler ve TGF-b1 gen ekspresyonunu gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak saptadılar. Sonuç olarak PLP verilen sıçanlarda diyabetik sıçanlara kıyasla albüminüri, glomerüler hipertrofi, mezangial genişleme, interstisyel fibrozu önemli ölçüde inhibe ettiğini PM'nin ise çok etkisi olmadığını saptamışlar. Böylelikle PLP'nin diyabetik nefropati gibi AGE kaynaklı hastalıkların tedavisinde umut verici olduğu öne sürülmüştür.

Jung Hoon Kang (2005); Beta-alanin ve L-histidin amino asitlerinin bir kombinasyonu olan ve aynı zamanda çok güçlü bir antioksidant olan karnozin'in MG/lizin/Fe⁺³ sistemiyle DNA'da oluşturulan hasarı önleme ve hidroksi radikalini söndürme aktivitesini incelemiştir. MG/lizin/Fe⁺³ sistemiyle oluşan hidroksi radikallerini tiobarbitürik asit-reaktif madde (TBARS) yöntemiyle ölçülmüş. Karnozinin hidroksi radikalini % 50-95 oranında söndürdüğü ve etkili bir glikasyon önleyicisi olduğu saptanmıştır.

Ali ve ark (2013); Antioksidantların DNA ve protein hasarını önleme etkisini araştırmışlar. *In vitro* olarak DNA'da MG/lizin/Fe⁺³ sistemiyle hasar oluşturup, pridoksin (P), Pridoksal-5-fosfat, Pridoksamin'in bu hasarı önleme etkisi jel elektroforez yöntemiyle incelenmiştir. Bu vitaminlerin PLP>P>PM sıralamasına göre DNA hasarını önlediğini gözlemlemişler. DNA da şeker ve şeker fofatlarının yaptığı hasarı göstermek amacıyla da MG/lizin/Fe⁺³ sistemine sırasıyla glukoz, glukoz-6-fosfat, riboz, riboz-5-fosfat, fruktoz-6-fosfat ve fruktoz-1,6-bis-fosfat ekleyip jel elektroforez yöntemiyle incelemişler. Şekerlerin DNA da glukoz< glukoz-6-fosfat< fruktoz-1,6-bis-fosfat< riboz=riboz-5-fosfat <fruktoz-6-fosfat sıralamasıyla hasar oluşturduğu rapor edilmiştir.

Hsin-Jung ve ark (2006); Metilglioksal ile indüklenen hücre hasarını, diyetle alınan ve hormon benzeri bir isoflavon olan genisteinin koruyucu etkisi *in vivo* olarak araştırılmıştır. Bu amaçla 24 haftalık dişi Wistar sıçanlarından rastgele seçilip herbiri on hayvandan oluşan dört gruba ayrılmıştır. Birinci gruba standart bir diyet uygulanmış. İkinci gruba 12 g/kg genistein içeren standart diyet uygulanmış. Üçüncü grubu standart diyetle birlikte 100 µM MG ilaveli su ile beslenilmiş. Dördüncü gruba ise 12 g/kg genistein içeren standart diyet ve 100 µM MG ilaveli su ile beslenilmiş. 2 Hafta sonra, mononükleer çalışmalar için doku örnekleri izole edilmiş. MG ilaveli grubun kontrol grubuna göre daha yüksek oranda hücre apoptozu gösterdiği belirlenmiştir.

Levi ve Werman (2001); Fruktöz, glukoz ve bunların fosfat türevlerinin, bir *Escherichia coli* konakçığında ampisiline direnç kazandıran seçilebilir bir amp genini içeren çift sarmallı DNA plazmidi (pBR 322) ile inkübasyonunda DNA'daki değişiklikleri ve hasarı agaroz jel elektroforezi ve antibiyotik direncinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Şekerler ve onların fosfat türevleri 3, 6, 9, 12, 15 gün 37 °C karanlıkta inkübe edilmiş zamana bağlı olarak DNA da değişikliklerin hızlandığı ve fruktozla karşılaştırıldığında fruktoz-6-fosfatın daha kolay reaksiyon verdiği glukoz-6-fosfatında glukozdan daha kolay reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir. Ampisilin direncinin 3 günlük inkübasyon süresinden sonra tamamen kaybolduğu ve transfekte *Escherichia coli* konakçı hücreler oluştuğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak fizyolojik aralıktaki konsantrasyonlarda fruktoz ve metabolitlerinin yüksek biyolojik sistemlerde (ökaryotik ve memeli hücrelerinde) DNA hasarının olası indüksiyonunda *in vivo* koşullar altında olası rolünün çok önemli olduğu ileri sürülmüştür.

Khan ve ark (2014); Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile glukoz veya metilglioksal kaynaklı glikasyon üzerine çörek otunun temel biyoaktif bileşeni olan *Tymoquinone* (TQ)'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. SOD 37 °C de hem glukoz (0.5M) ve metilglioksal (10 mM) ile ayrı ayrı hem de glukoz ve metilglioksal ile birlikte 10 gün inkübe edilmiş. Kontrol olarak da SOD tek başına inkübe edilmiş. Metilglioksal ile SOD'un 10 günlük inkübasyon süresi sonunda SOD'un kalıntı aktivitesinin % 46 olduğu ve metilglioksal ve glukoz ile SOD'un kalıntısının % 37 olduğu tespit edilmiştir. SOD/metilglioksal ve TQ (50 µM) ile bir saat inkübe edilmiş ve kontrol ile kıyasladığında SOD aktivitesindeki azalmanın % 8 olduğu gözlemlenmiştir. inkübasyon

süresi 10 güne çıkarıldığında ise SOD aktivitesindeki azalmanın % 47 olduğu tespit edilmiştir. TQ'nun kısa süreli glikasyonda koruyucu etkisinin olduğu ileri sürülmüştür.

Chayaratanasin ve ark (2015). *Clitoria ternatea* (kelebek bezelyesi çiçeği) çiçek yapraklarının ekstraktının (CTE) fruktoz kaynaklı protein glikasyonu ve *in vitro* olarak albumin oksidasyonuna bağlı hasarlara karşı inhibisyon etkisi araştırılmıştır. BSA/fruktoz ve CTE bitki ekstraktının varlığında ve yokluğunda 7,14, 21 ve 28 gün 37 °C de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak Aminoguanidin kullanılmış. Glike BSA'nın floresans AGE oluşumu sırasıyla 355nm'de uyarılma ve 460 nm'de emisyon floresansları spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş. Glike BSA'daki fruktozamin miktarının 28 günlük inkübasyon sırasında kademeli olarak 2 kat arttığı ve 28.günde fruktozamin seviyesinin CTE ekstraktının 0.25-1.00 mg/ml konsantrasyon aralığında % 14,47 ile % 35,66 azalttığı pozitif kontrol Aminoguanidinin de 1.00 mg/ml'de %25.96 inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Glike BSA'nın karbonil içeriği deney süresi boyunca 3 kat ile 9.4 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. BSA/fruktoz CTE (0.25-1.00 mg/ml) ile birlikte protein karbonil içeriğindeki artışı belirgin bir şekilde azalttığı tespit edilmiş. 28.günde glike BSA ile karşılaştırıldığında, karbonil içeriği 0.25-1.00 mg/ml konsantrasyonda % 8.23 ile %11.34 oranında değişirken aminoguanidinde bu oran %17.71 olduğu saptanmıştır.

Caengprasath ve ark (2013). Pomelo (çin greyfurdu) ekstraktının meyve etinin fruktoz kaynaklı protein oksidasyonu ve glikasyona karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. BSA/fruktoz sisteminde pomelo ekstraktının varlığında ve yokluğunda 7, 14, 21 ve 28 gün inkübe edilmiş. Fruktozamin 0.25, 0.50, 1.00 ve 2.00 mg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %3.7, % 9.9, %17.5 ve %30 inhibe edildiğini ve pozitif kontrol Aminoguanidinin ise % 12.5 (0.50 mg/ml) inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Floresan olmayan AGE'lerin oluşumu için biyolojik belirteç olarak kullanılan CML'nin oluşumunu % 90 oranında (0.50 mg/ml) inhibe ettiği ve Aminoguanidinin ise aynı konsantrasyonda % 60 inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. BSA/fruktoz sistemindeki protein karbonil miktrını ise 1.00 ve 2.00 mg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %9.2 ve % 28.5 azalttığı poziti kontrol Aminoguanidinin ise (0.50 mg/ml) % 11.1 azalttığı tespit edilmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

Bu çalışmanın materyalini oluşturan *Silybum marianum* L. Gaertner (Meryemana dikenini) bitkisinin tohumu Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Süleyman KIZIL tarafından kültürlü yapılarak elde edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkinin Monografisi

Silybum marianum, deve dikenini olarak da bilinir, *Asteraceae* bitki ailesinin yıllık veya iki yıllık bir bitkisidir. Güney Avrupa ve Asya'nın yerli bir bitkisi olup şimdi dünya çapında bulunmaktadır. Bitkinin tıbbi kısımları olgunlaşmış tohumlarıdır. Deve dikenini kırmızımsı mor çiçekler ve parlak beyaz damarlar ile soluk yeşil yapraklara sahiptir. 40 ile 100 cm arasında büyür. Yaprakları oblong lanseolattır.



3.1.1.1. Silmarinin Kimyasal Bileşimi

Deve dikenininin başlıca ekstresi, olgunlaşmış meyvelerde % 4 ile % 6 arasında silmarin'dir. Ana bileşen (% 60) silybin'dir ve aynı zamanda biyolojik açıdan en aktif bileşendir. Diğer bileşenler bir metabolik uyarıcı olan silichristin ve silydianindir. Silmarin, bitkinin meyvelerinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Dört flavonolignan izomerin yani silybin, izosilybin, silydianin ve silychristinin kompleks bir karışımıdır. Silmarin, *Silybum marianum* L. tohumlarından elde edilen biyoaktif bir özüttür ve % 65-85 silychristin, izosilychristin, silydianin, silybin A ve B, izosilybin A ve B gibi flavolignanları ve ayrıca % 20-35 yağ asitleri, flavonoidler ve diğer polifenolikleri de

içerir. Doğal bileşik olan silybin iki diastereomer karışımıdır (yaklaşık 1:1 oranında): silybin A/B. Silmarin silibinin A ve B/silybin/silmarin I, izosilybinin A/B, silychristin/silmarin II ve silydianin içeren bir kompleks flavonolignandır (Pradhan ve Girish 2006).

3.1.1.2. Silmarinin Sağlık Faydaları

Deve dikenini, sarılığın yanı sıra hepatit tedavisinde kullanılabilecek çok faydalı bir bitkidir. Kanseri tedavisinde enfeksiyon aşırı alkolizm veya kemoterapiden dolayı hasar gören karaciğer için çok yararlı bir ilaçtır. Deve dikenini kemoterapi alan kanser hastaları tarafından kullanıldığında radyasyondan dolayı karaciğere yapılan hasarların azaltılmasında ve kemoterapi tedavisinin bitiminden sonra yan etkilerden kurtulmanın kolaylaştırılmasında çok faydalıdır. Laboratuvar çalışmaları, silmarin'in hücre bölünmesini inhibe etme, kanser hücrelerinin ömrünü kısaltma ve tümörlere kan tedarikini azaltma kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir. Silymarin, tip 2 diyabet tedavisinde de etkilidir. Silmarin tip 2 diyabetli hastalarda insülin direncini azaltma yeteneğine sahiptir. Deve dikenini ekstraktında bulunan flavonoidler DNA ve hücresel yapılara zarar veren karsin ve reaktif bileşikler olan serbest radikalleri söndüren güçlü antioksidanlardır. Kanseri, diyabet, karaciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer hastalıkları önlemek için vücut tarafından antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Klinik araştırmaların sonuçları silmarin'in lösemi için kemoterapinin zararlı yan etkilerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Tahera ve ark. 2005).

Anti-tüberküloz ilaçlarının çeşitli yan etkileri bilinmektedir. Bilinen en iyi toksik ilaç etkisi hepatotoksisitedir. Bu gibi durumlarda silmarin karaciğerin korunması ve karaciğer yenilenmesinde etkili bir ajan olarak görev yapar. Tüberküloz tedavisinde etkin anti-tüberküloz ilaçları isoniazid, rifampisin ve pirazinamid etkili ilaçlardır ancak bu ilaçların kullanımı dokularda, özellikle karaciğerde hepatite yol açan toksik reaksiyonlarla ilişkilendirilir. *S. marianum*'dan elde edilen güçlü antioksidan aktiviteye sahip standart bitki özütü silmarin, karaciğer korunması ve karaciğer rejenerasyonu için etkili bir madde olarak bilinir. Silmarin karaciğerdeki glutatyonu sağlıklı kişilerde % 35'den daha fazla ve sıçanlarda da % 50'den fazla artırır. Glutatyon, geniş bir hormon, ilaç ve kimyasal detoksifikasyondan sorumludur. Karaciğerde yüksek düzeyde glutatyon detoksifikasyon kapasitesini artırır (Katiyar 2005).

3.1.1.3. Silmarinin Farmakolojik Özellikleri

Deve dikeni en aktif bileşen olarak silmarin içerir. Silmarin karaciğer hastalığı gibi birçok hastalık için de potansiyel olarak faydalı olabilir. Silmarin antiviral, antibakteriyel, antioksidant, antikanser ve hepatoprotektif özelliklere sahiptir (Hadaruga ve Hadaruga 2009).

Silmarin ilaçlardan kaynaklanan hepatotoksistide ve hepatobiliyer hastalıklarında hepatoproteksiyon için yararlı bir ilaçtır. Silmarin, dejeneratif nekroz ve fonksiyonel bozuklukla karakterize birçok karaciğer rahatsızlığının tedavisinde kullanılır. Bileşik aynı zamanda hepatositleri radyasyon, aşırı demir yüklenmesi ve viral hepatite bağlı yaralanmalara karşı korur. Bir antioksidan olarak silmarin toksinlere maruz kalan hücrelere zarar verebilen serbest radikalleri temizler. Silmarin'in antioksidan aktivitesinin E vitamininden on kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Madani ve ark. 2008).

Silmarin aynı zamanda hücre kültüründe önemli antioksidan enzim süperoksit dismutaz seviyesini de artırır. Karaciğerdeki protein sentezini uyarır ve bu da hasar gören hücrelerin yerine yeni karaciğer hücrelerinin üretiminde artışa neden olur.

Silmarin'in bir antioksidan ve hepatoprotektif ajan olarak rolü iyi bilinmesine rağmen, bir antikanser ajan olarak rolü ortaya çıkmaya başlamıştır. Kapsamlı araştırmalar silmarin'in örneğin prostat, göğüs, yumurtalık, kolon, akciğer, mesane vs. gibi çeşitli tümör hücrelerinin poliferasyonunu bastırabildiğini göstermiştir. Bu, G₁/S fazındaki hücre döngüsünün durdurulması, siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin indüklenmesi (p15, p21 ve p27 gibi) ve anti-apoptotik gen ürünlerinin aşağı regülasyonu (örneğin, Bcl-2 ve Bcl-XL), hücre sağ kalımı kinazlarının inhibisyonu (AKT, PKC ve MAPK) ve enflamatuar transkripsiyon faktörlerinin (örneğin, NF-kappaB) inhibisyonu vasıtasıyla başarılır. Silmarin aynı zamanda tümör hücrelerinin istila (MMP-9), anjiyogenez (VEGF) ve metastazının poliferasyonunda rol oynayan gen ürünlerini (cyclin D1, EGFR, COX-2, TGF-beta, ICF-IR), aşağı yöne regüle edebilir (Agarwal ve ark 2006).

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Glukoz (Sigma-Aldrich), glukoz-6-fosfat (Sigma-Aldrich), fruktoz-1,6-bisfosfat (Sigma-Aldrich), riboz (Sigma-Aldrich), riboz-5-fosfat (Sigma-Aldrich), fruktoz (Sigma-Aldrich), fruktoz-6-fosfat (Sigma-Aldrich), metilglioksal (Sigma-Aldrich), gallik asit (Sigma-Aldrich), BSA (Bovin serum albümin) (Sigma-Aldrich), aminoguanidin (Sigma-Aldrich), EcoR1 digested DNA (Sigma-Aldrich), HindIII DNA (Sigma-Aldrich), PBR 322 Plazmid DNA (Sigma-Aldrich), etanol (Sigma-Aldrich), agaroz (Sigma-Aldrich), folin ciocalteu's fenol reaktifi (Merck), Quercetin (Fluka), pridoksin (P) (Sigma-Aldrich), pridoksal 5- fosfat (PLP) (Sigma-Aldrich), pridoksamin (PM) (Sigma-Aldrich), Nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich), trolox (Sigma-Aldrich), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich), demir-III-klorür (Merck), sodyum azid (Merck), guanidin, 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6- sülfonikasit) (ABTS) (Sigma-Aldrich), Griard-T reaktifi (Sigma-Aldrich), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) (Sigma-Aldrich), trikloroasetikasit (TCA) (Sigma-Aldrich), sodyum dodesilsülfat (Sigma-Aldrich), etidyum bromür (Sigma-Aldrich), lizin (Sigma-Aldrich), bromofenol blue (Sigma-Aldrich), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) (Sigma-Aldrich), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) (Sigma-Aldrich).

3.1.3. Kullanılan Aletler

Jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Quantity One programı, 4.5.2 versiyonu), Yatay DNA elektroforez (Biorad), Dikey SDS-PAGE elektroforez (Biorad) güç kaynağı (Biorad-power PAC 3000), UV-visible, Cary 100 spektrometre (Varian), santrifüj (Universal 320R Hettich), santrifüj (mini spin plus-eppendorf), vorteks (Heidolph), sterilizatör (Heraeus), liyofilizatör (christ, alpha 2-4 LD), otoklav (Hirayama-HV-502), çalkalayıcı (Memmert), terazi, pH metre (Mettler Toledo), çeker ocak, vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), membran filtresi (Schleicher&Schuell), blender, -20 derin dondurucu (Sanyo), mikrodalga fırın ve buzdolabı (Arçelik) cihazları kullanıldı.

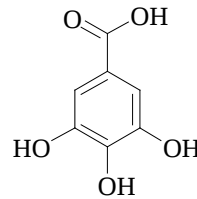
3.2. METOT

3.2.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması

40 g *Silybum marianum* bitki tohumu Waring Commercial elektronik laboratuvar blender da öğütölüp soxhlet kartuşlarına alındı. Kartuşlar soxhlet ekstraktörüne yerleştirildi ve bitki tohumundan yağın arındırmak için 60 °C’de 400 ml petrol eteriyle 6 saat ekstraksiyon yapıldı. Yağından arındırılmış olan bitki tohumu tekrar 400 ml etanol:su (1:1) çözücü sistemi ile 6 saat ekstrakte edildi. Çözücü olarak kullanılan etanol, Heidolph Rotary Evaporatörle uçuruldu. Geriye kalan su ekstraktı sıvı azotta dondurulup Christ Alpha 1-2 LD plus liyofilizatörde 24 saat -86 °C ve 0,0021 mbar basınç altında dondurularak kurutuldu. % 6.12 verim ile 2,45 g *Silybum marianum* bitki tohumu ekstraktı elde edildi.

3.2.2. Total Fenolik Bileşen Miktar Tayini

S. marianum bitki tohumunun etanol:su (1:1) ekstraktının içerisindeki toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteus tarafından tanımlanan prosedürün modifiye edilmiş versiyonuna göre belirlendi (Singleton ve ark. 1999). Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir. Fenolik bileşiklerden bazik ortamda (pH=10) FCR’ye elektron transfer edilmesiyle oluşan mavi renkli kompleksin 765 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanan bir yöntemdir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri (µg/ml) olarak hesaplanır.



Şekil 3.1. Gallik asitin yapısı

Gallik asitin 5 mg/ml’lik stok çözeltisi hazırlandı ve bu stok çözeltiden 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µg/ml’lik konsantrasyonlarında seyreltilmiş çözeltiler hazırlandı. *S. marianum* bitki ekstraktının 1 mg/ml’lik çözeltisi etanolde hazırlandı. Konsantrasyonlarına göre gallik asit ve ekstrakt çözeltisinden 40 µl alındı ve üzerlerine

1160 µl saf su ve 200 µl 2N Folin reaktifi ilave edilip vorteksleme yapıldı. Bu karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 600 µl % 20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip vorteksleme yapıldı. Karışım oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalamalı inkübatör'de inkübe edildi. Daha sonra Spektrofotometre cihazı ile 765 nm'de absorbansları ölçüldü.

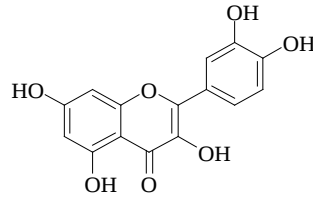
Gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0,0024 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g}) \quad (R^2 = 0.9987)$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı.

3.2.3. Total Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

S. marianum bitki tohumunun etanol-su ekstraktının flavonoid içeriği Zhishen ve ark. (1999) tarafından tanımlanan alüminyum klorür kolorimetrik yöntemle tayin edildi. Bu yöntem, AlCl₃'ün, flavonların ve flavonollerin C-4 keto grupları ve C-3 veya C-5 hidroksil grubu ile asit kararlı kompleksler oluşturması prensibine dayanır. Standart olarak quercetin kullanıldı ve bitki ekstraktı içindeki toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eşdeğer olarak hesaplandı.



Şekil 3.2. Quercetin yapısı

Quercetin metanol içindeki 100 µg/ml'lik stok çözeltisinden 1, 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Bitki ekstraktların 0.5 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. 1 ml quercetin ve 1 ml ekstrakt alınıp üzerlerine 0,1 ml % 10'luk Alüminyum (III) nitrat, 0,1 ml 1M potasyum asetat ve 3,8 ml metanol eklendi. Reaksiyon karışımı su banyosunda 25 °C'de 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 415 nm'de Spektrofotometre cihazı ile absorbans değerleri ölçüldü.

Quercetin'in artan konsantrasyonlarına karşı absorbands değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0,014 \times \text{quercetin } (\mu\text{g}) \quad (R^2=0,9974)$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktının içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eşdeğer (QUE) olarak hesaplandı.

3.2.4. İndirgeme Gücü

S. marianum bitki tohumunun etanol:su (1:1) ekstraktının indirgeme gücü Oyaizu (1986) tarafından tarif edilen kurulu bir prosedürün değiştirilmiş bir versiyonu kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemde BHT, BHA ve α -tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bitki ekstraktının ve pozitif kontrollerin 1 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 $\mu\text{g/ml}$ 'lik seyreltik çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 1ml alınıp üzerlerine 2,5 ml fosfat tamponu (0,2 M, pH=6.6) ve 2.5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] ilave edildi ve karışım vortekslendi, sonra 50 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 2,5 ml %10'luk trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve karışım iyice karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. İki faza ayrılan karışımın üst tabakasından 2,5 ml alınıp üzerine sırasıyla 2,5 ml saf su ve 0,5 ml % 0,1'lik FeCl_3 çözeltisi ilave edilip vorteks yapıldı. Sonra bu karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometre cihazı ile 700 nm'de absorbands ölçüldü ve artan konsantrasyona karşı absorbands değerleri grafiğe geçirildi. Yüksek absorbands değeri numunenin daha güçlü bir indirgeme gücü olduğunu gösterir.

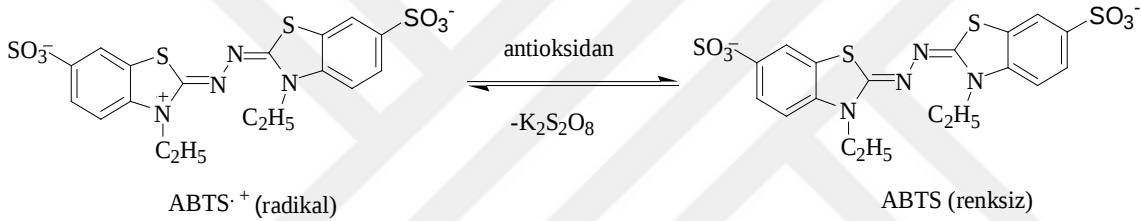
3.2.5. ABTS Radikal Katyonunu Söndürme Aktivitesi

S. marianum bitki tohumunun etanol:su (1:1) ekstraktının toplam radikal süpürme kapasitesi ABTS yöntemi kullanılarak tayin edildi. Bu yöntem ABTS'nin (2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucunda ABTS^+ radikal katyonunun oluşması ve bu radikalın ortamdaki antioksidanlar tarafından indirgenmesiyle 734 nm'de ölçülen absorbands değerlerinin azalmasıyla ifade edilir.

ABTS çözeltisi (7 mM) ve potasyum persülfat çözeltisi (2,45 mM) saf su içinde hazırlanıp karıştırıldı (v/v). ABTS stok çözeltisine potasyum persülfat eklenince ABTS

radikal katyonu (ABTS^{•+}) oluşur. Bu karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Koyu mavi renkli bir çözelti oluştu ve bu çözelti etanol ile 734 nm’de 0.70 absorbans değerine ulaşacak şekilde seyreltilti. 30 °C’de 6-10 dakika bekletildikten sonra dengeye ulaştı. 1mg/ml de hazırlanan ekstraktların farklı konsantrasyonlarından (100, 150, 200, 250, 300 µl) 100 µl alındı ve buna 1,9 ml ABTS radikal katyonu çözeltisinden ilave edilerek vorteksleme yapıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra Spektrometre cihazı ile 734 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. % inhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% I = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$



Şekil 3.3. 2,2’-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)’nin persülfatla oksidasyonu

3.2.6. *İn Vitro* Olarak BSA’nın Glikasyonu

3.2.6.1. BSA’ nın Fruktoz ile Glikasyonu

Glikasyon reaktanları olarak BSA ve fruktoz kullanımında modifikasyon takip edildi. 0,2 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,4, % 0,06 sodyum azid içeren) içinde BSA (60 mg/ml) ve fruktoz (1,5 M) hazırlandı. Bu karışım 100 µl BSA çözeltisi, 100 µl fruktoz çözeltisi ve 100 µl saf su içerecek şekilde cam tüplerde bitki ekstraktının ve pozitif kontrolün varlığında ve yokluğunda 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon karışımından 0, 7, 14 ve 21. günlerde örnekler alındı. Alınan örneklerden bağlanmamış şekerleri ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak için örneklerle eşit miktarda soğuk TCA (10 %) eklenerek +4 °C’de 15.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Supernatant döküldü, pellet 2 kez TCA ile yıkandıktan sonra fosfat tamponunda çözüldü ve bu reaksiyon karışımı -20 °C’ de saklandı.

BSA ve fruktoz glikasyonunun saptanması için pozitif kontrol olarak, glikasyon inhibitörü olarak bilinen Aminoguanidin (AG) kullanıldı. AG'nin 100 µl deiyonize suda 3 mM çözeltisi hazırlanarak kullanıldı. (Yamaguchi ve ark.)

3.2.6.2. Total AGE Floresans Ölçümü

Floresans spektrotroskopisi, AGE'lerin varlığını değerlendirmek için en doğru tekniklerden biridir. 370 nm dalga boyunda uyarılma ve 440 nm dalga boyunda emisyon, floresansta proteinlerdeki maillard ürün seviyesinin *in vitro* ve *in vivo* belirteçleri olarak yaygın kullanılır. Total AGE oluşumu, AGE ürünlerinin sırasıyla 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de emisyon floresansları kullanılarak ölçüldü. (Ardestani ve Yazdanparast, 2007). AGE inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% I = [(F_{\text{Kontrol}} - F_{\text{örnek}}) / F_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

(F_{Kontrol}: İnhibitör içermeyen örneğin floresans değeri F_{örnek}: İnhibitör içeren örneğin floresans değeri)

3.2.6.3. Fruktozamin Testi

Fruktozamin testi kolorimetrik bir yöntemdir. Alkali koşullar altında fruktozamin veya glikozlanmış serum proteinleri nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirger. Oluşan mor renk doğrudan fruktozamin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Fruktozamin testi biraz modifikasyonla Baker, Zyzak ve Baynes (1994) metoduna göre yapıldı. Glikolizlenmiş örneklerden 80 µl alındı ve üzerlerine sodyum karbonat tamponu (100 mM, pH 10,35) içinde hazırlanmış 1,6 ml nitroblue tetrazolium ilave edildi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 530 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. AG pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.2.6.4. α-Dikarbonil Bileşiklerinin Tayini

BSA/fruktoz sistemiyle glikolizlenmiş örneklerdeki α- dikarbonil miktarı Girard-T testiyle belirlendi. Glikolizlenmiş örneklerden 40 µl alınıp 160 µl saf su ve 100 µl Griard-T reaktifi (0,5 M) ve 1700 µl sodyum format (pH 2.9) ile test tüpünde karıştırıldı ve 25°C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. 290 nm'de absorbans ölçüldü. AG pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.2.6.5. Protein Karbonil Miktar Tayini

Protein oksidasyonunun bir göstergesi olarak protein karbonil içeriği Levine ve ark. (1990)'nın metoduna göre belirlendi. BSA/fruktoz sistemiyle glikolizlenmiş örneklerden 100 µl alındı ve üzerlerine 2 M HCl ile hazırlanmış 1 ml 10 mM 2,4-difenil hidrazin (DNPH) çözeltisi eklendikten sonra 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra bu karışıma 1 ml soğuk % 10 TCA (w/v) ilave edildi. TCA çözeltisi proteinlerin çökmesini sağlamaktadır. Karışım 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldükten sonra deney tüpünün dibindeki protein pelleti 2 ml etanol:etil asetat (1:1, v/v) karışımı ile 3 defa yıkandı. Bu pellet daha sonra 1 ml 6 M guanidine-HCl ile süspansiyon haline getirilip 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak, ortamdaki kalıntıları çöktürmek için 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. 374 nm'de absorpsiyon değerleri ölçüldü.

3.2.6.6. Protein Glikasyonunun SDS-PAGE Karakterizasyonu

BSA/fruktoz sisteminde inkübe edilen örneklere SDS-PAGE protein jel elektroforezi uygulandı. 20 µl inkübasyon karışımına 100 µl SDS-PAGE örnek hazırlama tamponu eklendi. (Örnek hazırlama tamponu; 0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8), 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) gliserol, 1 % (v/v) 2-merkaptoetanol ve 5 % (w/v) bromofenol blue içermektedir). Örnekler 100 °C'de 5 dakika kaynatıldı. Her örnekten 5 µl alınıp jelle yüklendi. Jel BioRad tankı içerisinde, BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak, her jel için 140 mA ve 300 volt akım uygulanarak yürütücü tampon içinde (Tris base, glisin, SDS) 120 dakika yürütüldü. Bu işlemin sona ermesiyle jeller %15'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 1 saat süreyle renklendirildikten sonra boya çıkarma solüsyonu (su:metanol:glasiyel asetik asit: 6:3:21, v:v:v) içinde bekletilerek boya uzaklaştırıldı.

3.2.6.7. Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikte Sunulması

Glikolizlenmiş Proteinin miktarını ve band yoğunluğunu belirleme jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı (Gel-Doc-XR; BioRad, Hercules, CA, USA). Jeller üzerindeki bantlar Quantity One Programme sistemiyle belirlendi (version 4.5.2, BioRad). Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grupla standardize edildi. Sonuçlar 3 farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi.

3.2.7. *İn Vitro* Olarak DNA'nın Glikasyonu

3.2.7.1. DNA'nın Lizin ve Metilglioksal ile Glikasyonu

100 mM'lık potasyum fosfat tamponunda (pH 7,4) pBR 322 plazmid DNA (0,5 µg), lizin (20 mM), metilglioksal (20 mM), Fe⁺³ (100 µM) ve silmarin etanol:su (1:1) ve ticari silmarin ekstraktlarının (100-1000 µg/ml) varlığında ve yokluğunda 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu iki saatlik inkübasyon süresi dolduktan sonra bu karışım -20 °C de 60 dakika dondurularak reaksiyon durduruldu. Örnekler 3 µl yükleme tamponu eklenerek agaroz jele yüklemeye hazır hale getirildi. Pozitif kontrol olarak pridoksin (P) , pridoksal 5-fosfat (PLP) ve pridoksamin (PM) kullanıldı. Agaroz (1 g), 100 ml Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) eklendi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. 60 °C'ye soğutuldu. 1,5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılan ve tarak yerleştirilen cam tabakaya döküldü. Jelin donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletildi. Kullanıma hazır olan jelin kuyucuklarına hazırladığımız örneklerden yüklendi ve 200 ml Tris asetat tamponunda (40 mM tris asetat, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika yürütüldü. Jel fotoğrafları Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekilip, jel üzerindeki DNA bantları Quantity One Programme sistemiyle belirlendi. (version 4.5.2, BioRad) (Suji ve ark., 2007).

3.2.7.2. DNA'nın Şeker ve Şeker Fosfatları ile Glikasyonu

100 mM'lık potasyum fosfat tamponunda (pH 7,4) pBR 322 plazmid DNA (0,5 µg), lizin (20 mM), metilglioksal (20 mM), Fe⁺³ (100 µM) ve glukoz (250 mM), glukoz-6-fosfat (250 mM), riboz (250 mM), riboz-5-fosfat (250 mM), fruktoz (250 mM), fruktoz-6-fosfat (250 mM), fruktoz 1,6-bisfosfat (250 mM) şeker ve şeker fosfatları ile 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu iki saatlik inkübasyon süresi dolduktan sonra bu karışım -20 °C de 60 dakika dondurularak reaksiyon durduruldu. Örnekler 3 µl yükleme tamponu eklendi, örnekler jele yüklendi ve 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika yürütüldü. Jellerin fotoğrafı çekilip, bant yoğunlukları hesaplandı (Ahmed ve ark.)

3.2.7.3. DNA'nın Fruktoz ile İnkübasyonu

Tris-HCl tamponu (50 mM; pH: 8,0) içerisinde, DNA ve fruktoz (0,4 M) 37° C'de, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Örnekler 0, 3, 5 ve 7 gün bekletildikten sonra, 3 µl yükleme tamponu eklendi ve agaroz jeli hazırlandı. Kullanıma hazır olan jelin kuyucuklarına hazırladığımız örneklerden yüklendi. Jel 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika yürütüldü. Jellerin fotoğrafı çekilip, bant yoğunlukları hesaplandı (Sahar ve ark. 2010).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

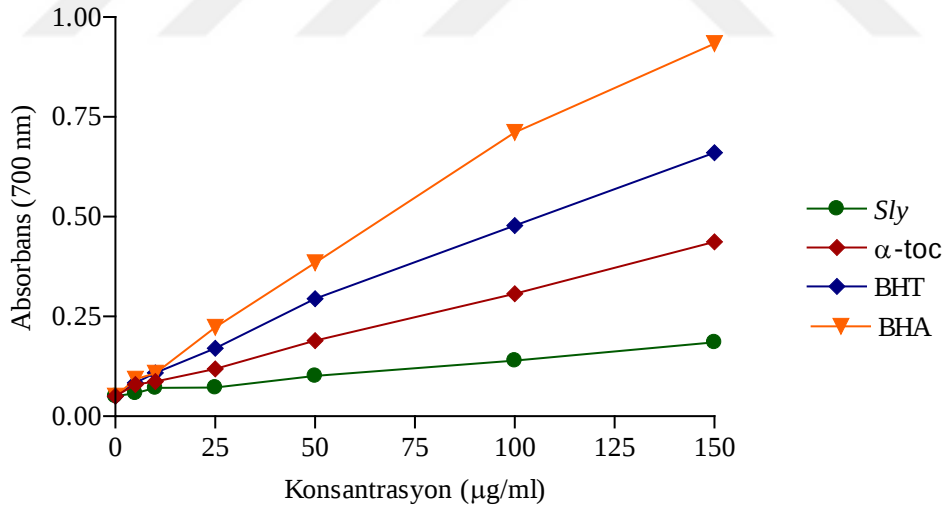
4.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

Çizelge 4.1. *S. marianum* bitkisinin etanol:su (1:1) ekstraktının içindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik ve quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları. Değerler üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapması (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktar Tayini		
Bitki ekstraktı	Gallik asit eşdeğeri ($\mu\text{g GAE/mg}$ ekstrakt)	Quercetin eşdeğeri ($\mu\text{g QUE/mg}$ ekstrakt)
<i>S. marianum</i>	262.70 ± 13.84	10.50 ± 1.01

4.2. İndirgeme Gücü

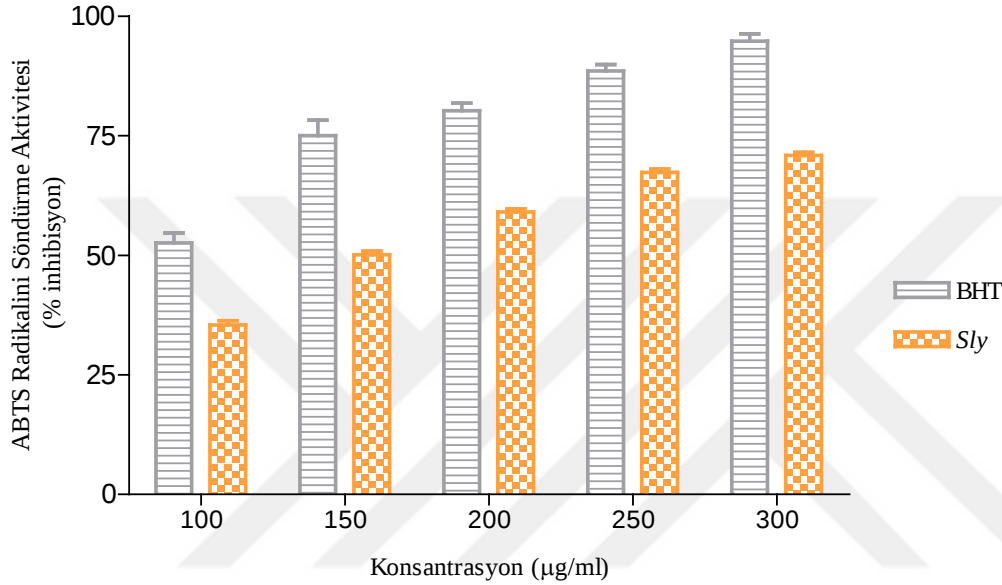
Bitki ekstraktının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme gücüne bakıldı. İndirgeme gücü konsantrasyona karşı absorbans olarak verildi (Şekil 4.1.). Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir.



Şekil 4.2. *S. marianum* bitki tohumunun etanol:su (1:1) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT BHA ve α -tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.3. ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi

ABTS radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 100-300 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *S. marianum* bitkisinin etanol:su (1:1) ekstraktının ABTS radikalini söndürme aktivitesi % 35.4 ± 1.5 - 70.8 ± 1.1 pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'nin ise % 52.5 ± 3.6 - 94.7 ± 2.6 olarak hesaplandı.

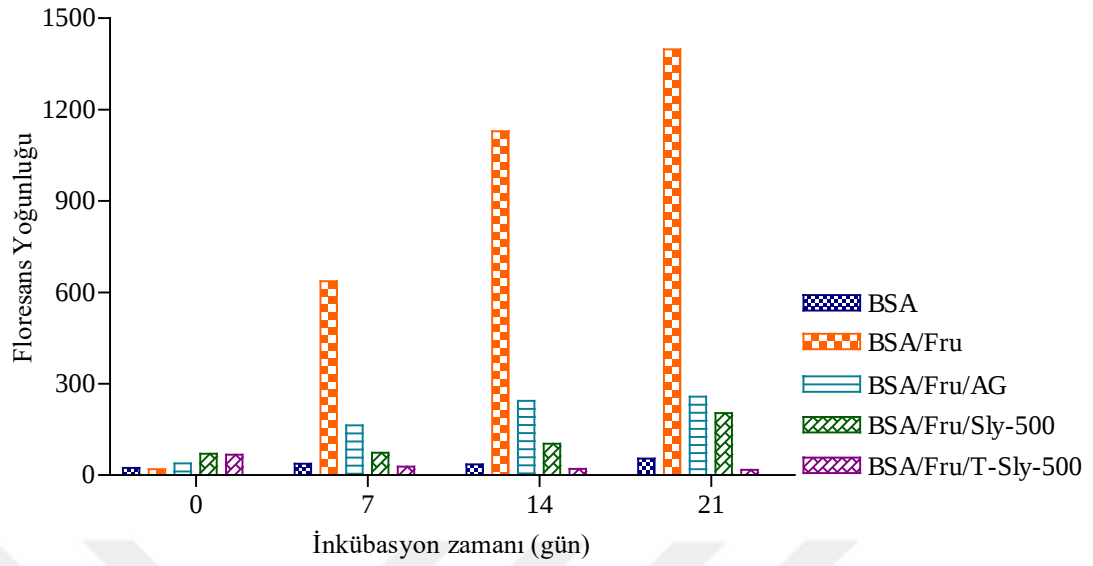


Şekil 4.3. *S. marianum* bitkisinin etanol:su ekstraktının farklı konsantrasyonlarının ABTS radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

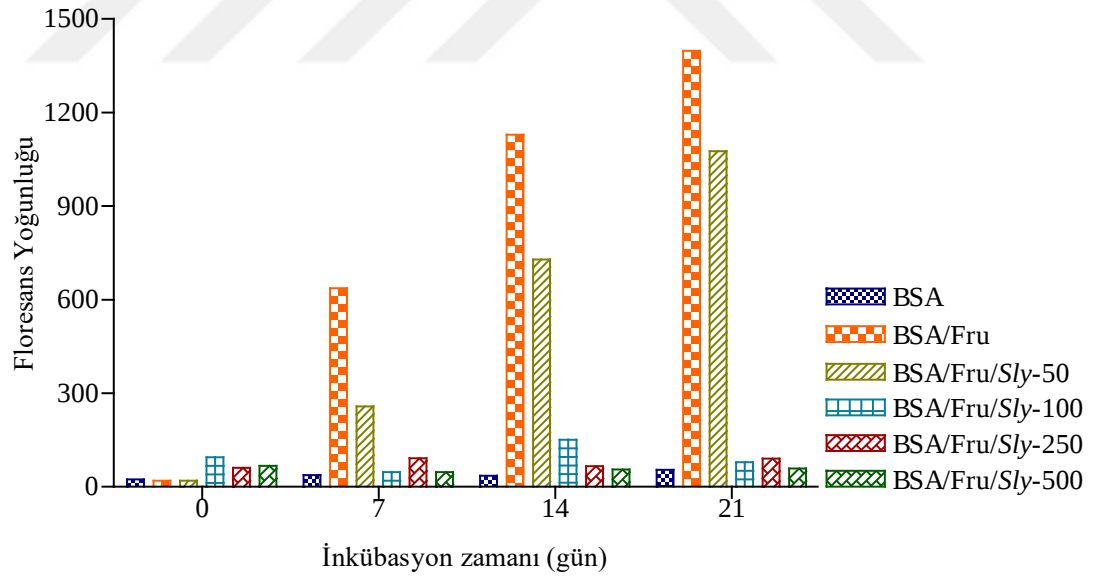
4.4. *In vitro* olarak BSA'nın Glikasyonu

4.4.1 Total AGE Floresans Ölçümü

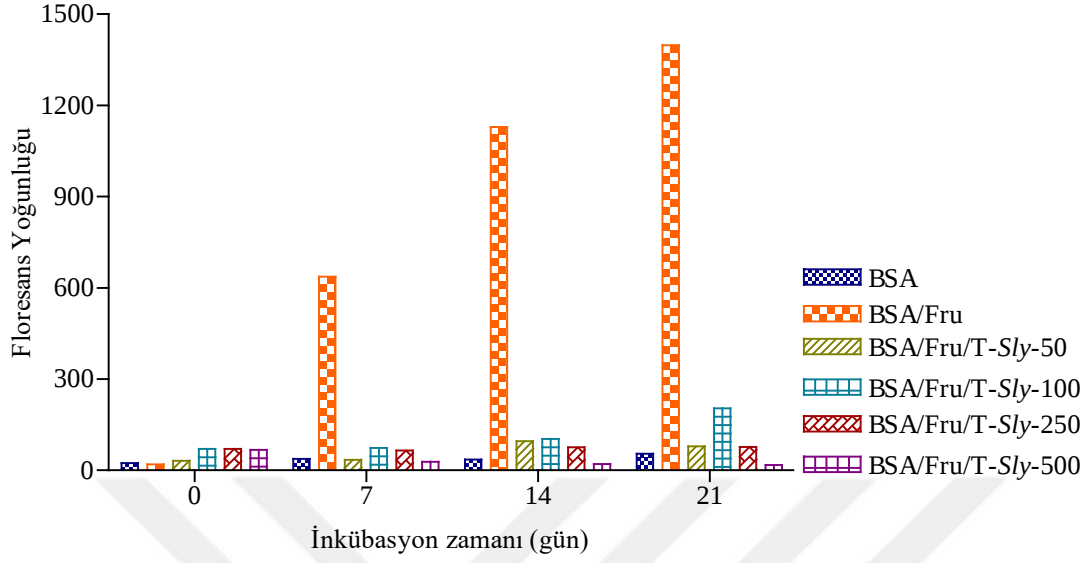
Total AGE oluşumu, AGE ürünlerinin sırasıyla 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de yayılma floresansları kullanılarak ölçüldü. Aminoguanidinin AGE inhibisyonu; 7. gün: % 74.04, 14. gün: % 78.29, 21. gün: % 81.83 olarak hesaplandı. BSA/fru sisteminde *Silybum marianum* etanol:su (1:1) ekstraktının (500 µg/ml)'nin AGE inhibisyonu; 7. gün: % 92.57, 14. gün: % 95.06, 21. gün : % 98.82, ticari silmarin ekstraktının total AGE inhibisyon yüzdesi ise 7. gün: % 95.52, 14. gün: % 98.17, 21. gün: % 98.73 olarak hesaplandı.



Şekil 4.4.1.1. BSA/fru/AG (500 µg/ml), BSA/fru/*S. marianum* (500 µg/ml), BSA/fru/ticari silmarin (500µg/ml), sistemlerinin total floresans yoğunluğu

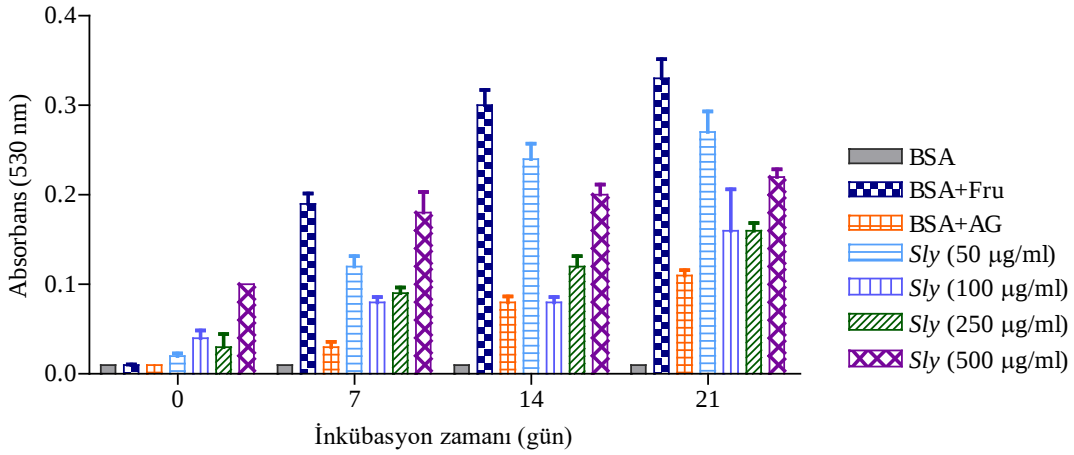


Şekil 4.4.1.2. BSA/fru/*S. marianum* (50-500 µg/ml), sisteminin total AGE floresans yoğunluğu

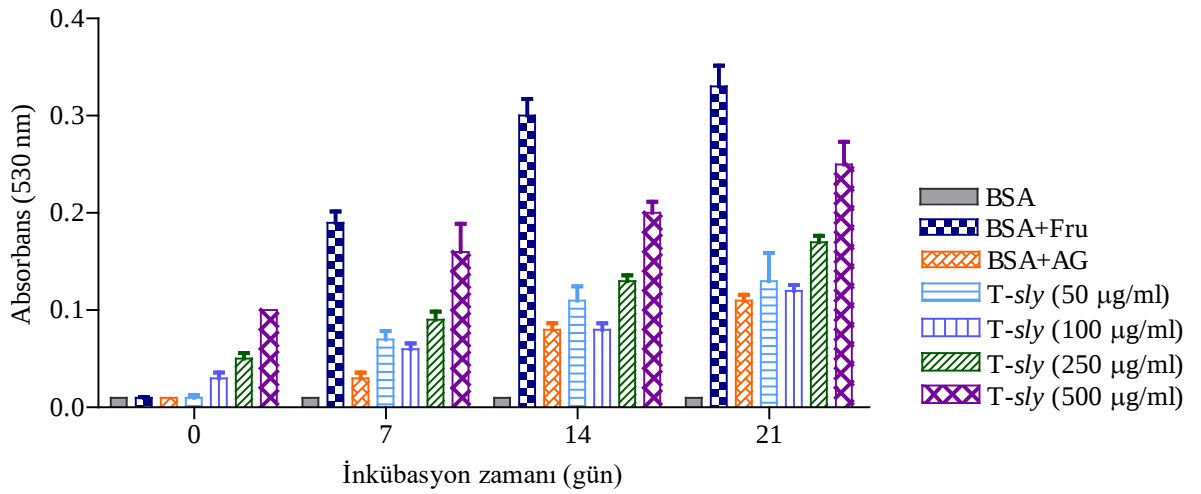


Şekil 4.4.1.3. BSA/fru/ticari silmarin (50-500 µg/ml), sisteminin total AGE floresans yoğunluğu

4.4.2. Fruktozamin Testi

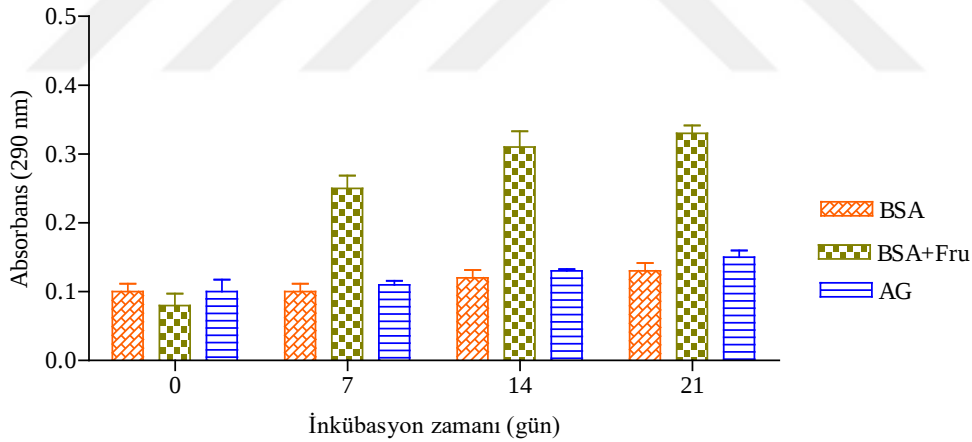


Şekil 4.4.2.1. BSA/fru/Aminoguanidin (AG) ve BSA/fru/*S. marianum* sisteminde inkübasyon sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

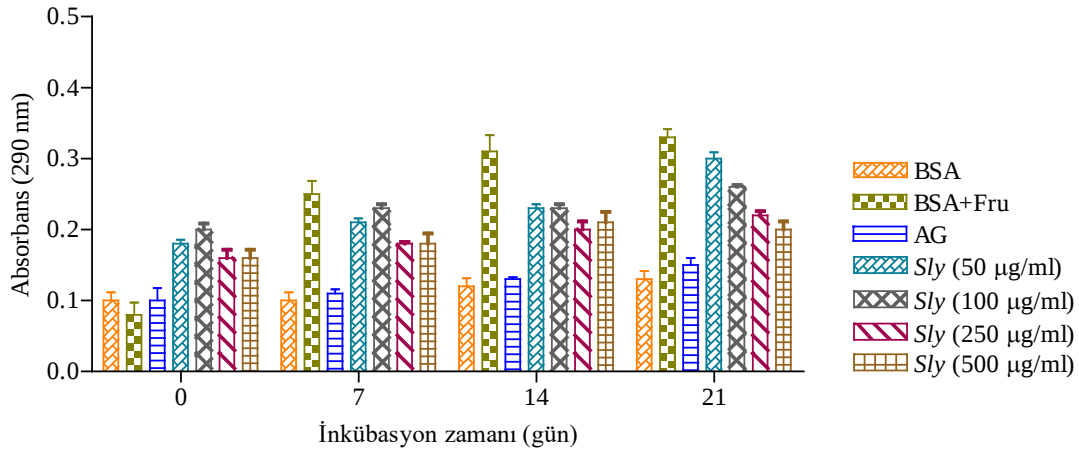


Şekil 4.4.2.2. BSA/fru/Aminoguanidin (AG) ve BSA/fru/ticari silmarin sisteminde inkübasyon sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

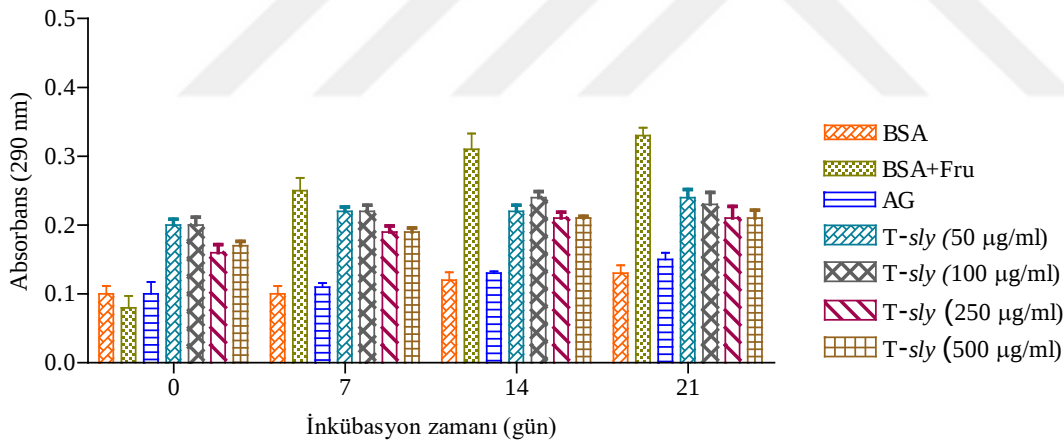
4.4.3. α -Dikarbonil Tayini



Şekil 4.4.3.1. BSA'nın Aminoguanidin (AG) varlığında fruktoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α -dikarbonil ürünlerinin oluşumu üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

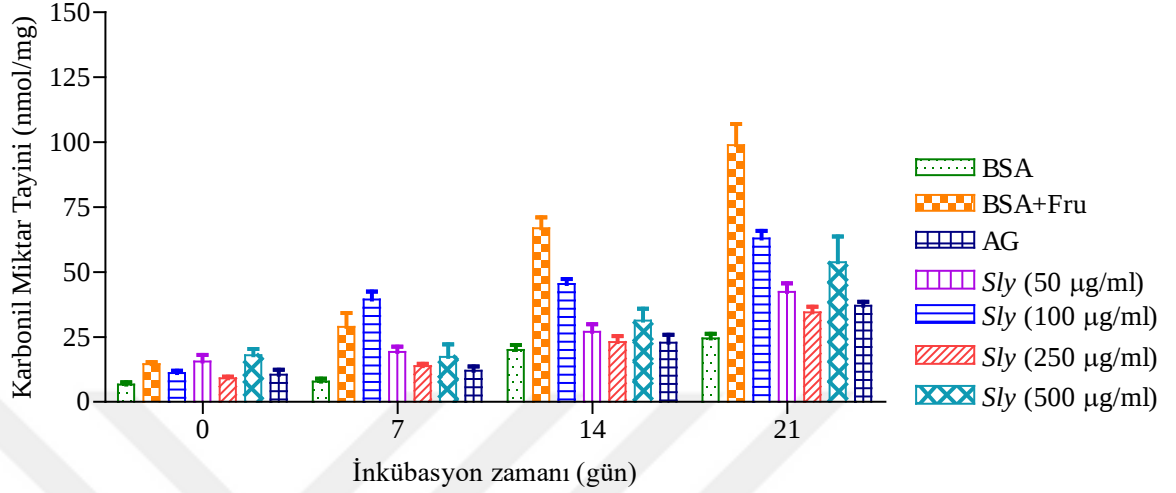


Şekil 4.4.3.2. *S. marianum* etanol:su (1:1) ekstraktının BSA/fru'nun inkübasyonu sonucu oluşan α -dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

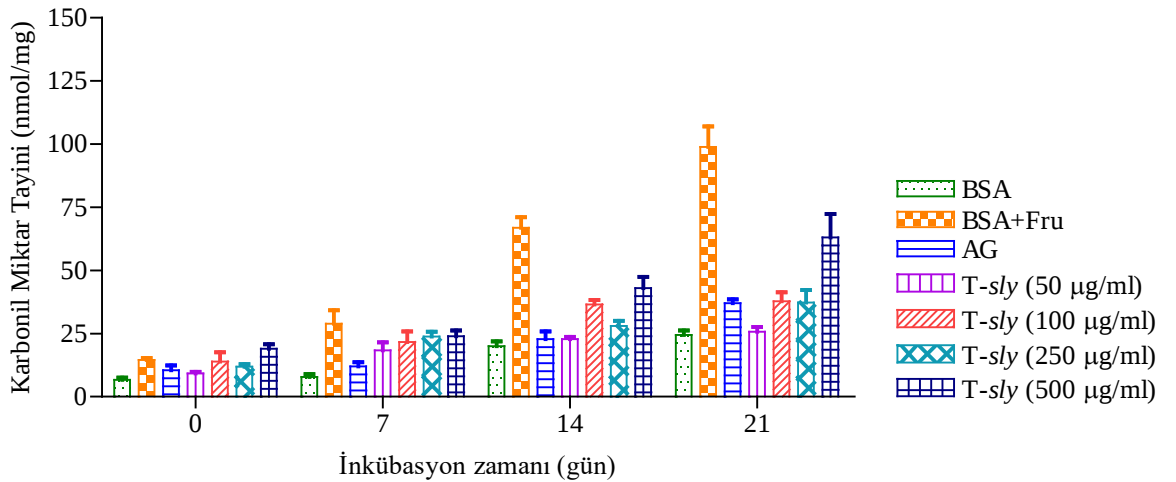


Şekil 4.4.3.3. Ticari silmarin ekstraktının BSA/fru'nun inkübasyonu sonucu oluşan α -dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.4.4. Protein Karbonil Miktar Tayini

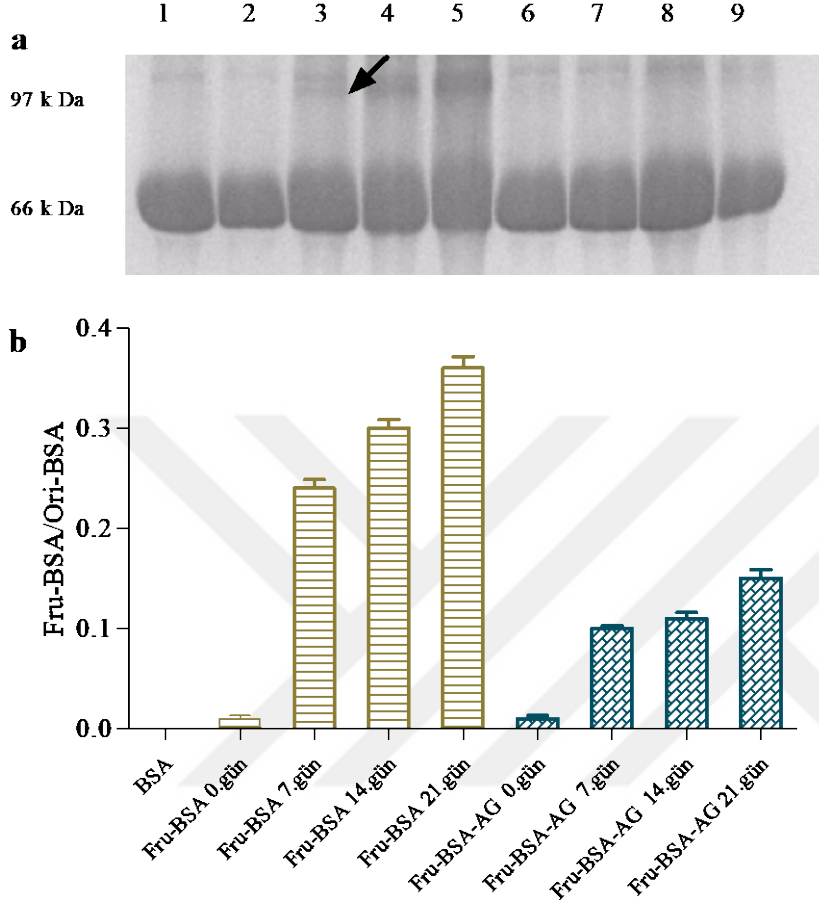


Şekil 4.4.4.1 BSA/fru sisteminde Aminogunidin ve *S. marianum* bitki ekstraktının varlığında protein karbonil miktarındaki değişikliğin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

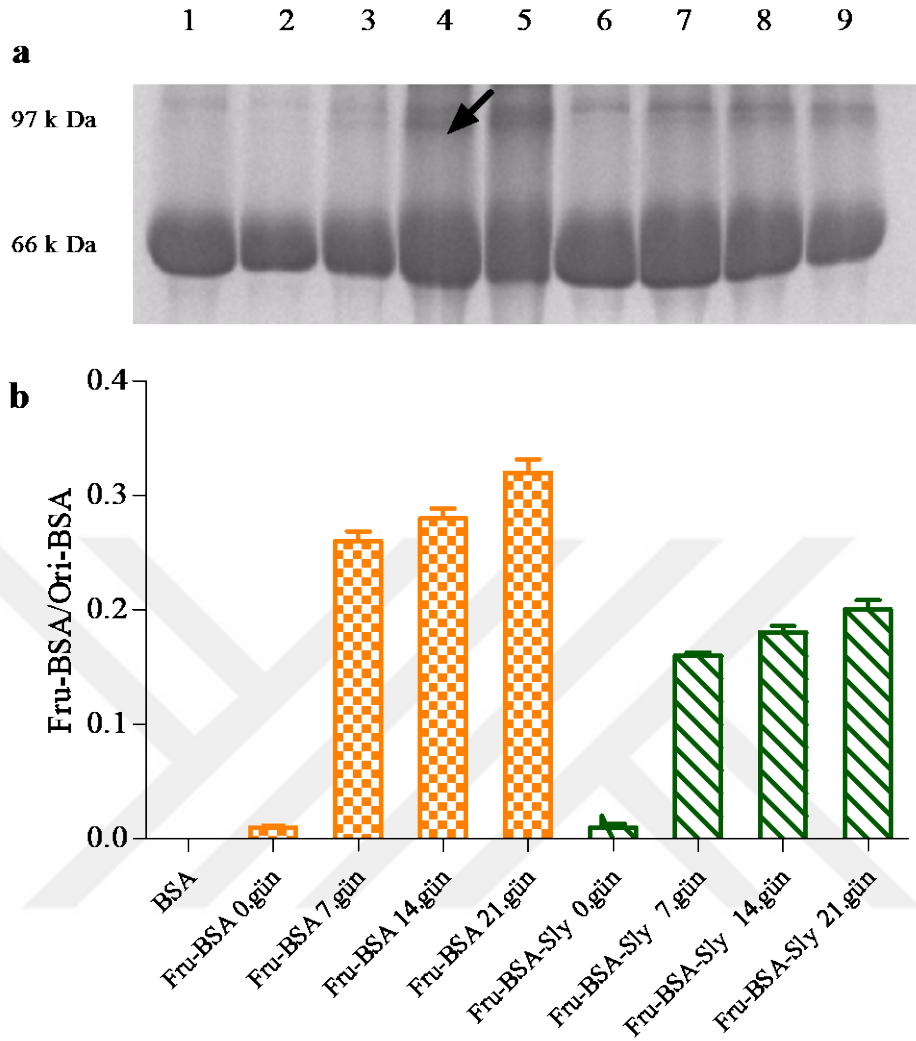


Şekil 4.4.4.2 BSA/fru sisteminde Aminogunidin ve ticari silmarin bitki ekstraktının varlığında protein karbonil miktarındaki değişikliğin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

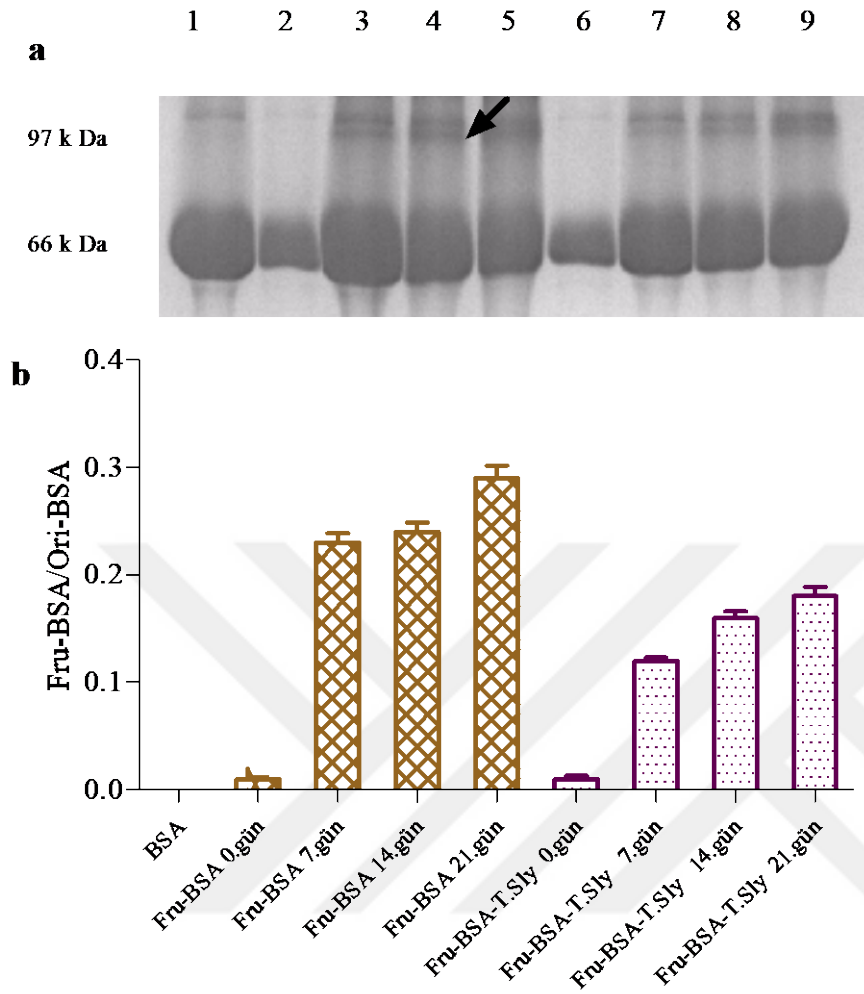
4.4.5. Glikolizlenmiş Proteinin SDS-PAGE Karakterizasyonu



Şekil 4.4.5.1. Fruktoz ile glike olan proteinin AG varlığında SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Fruktoz 0.gün, **3.** BSA+Fruktoz 7.gün, **4.** BSA+Fruktoz 14.gün, **5.** BSA+Fruktoz 21.gün **6.** BSA+Fruktoz+AG 0.gün, **7.** BSA+Fruktoz+AG 7.gün, **8.** BSA+Fruktoz+AG 14.gün, **9.** BSA+Fruktoz+AG 21.gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Fruktoz ile glike BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



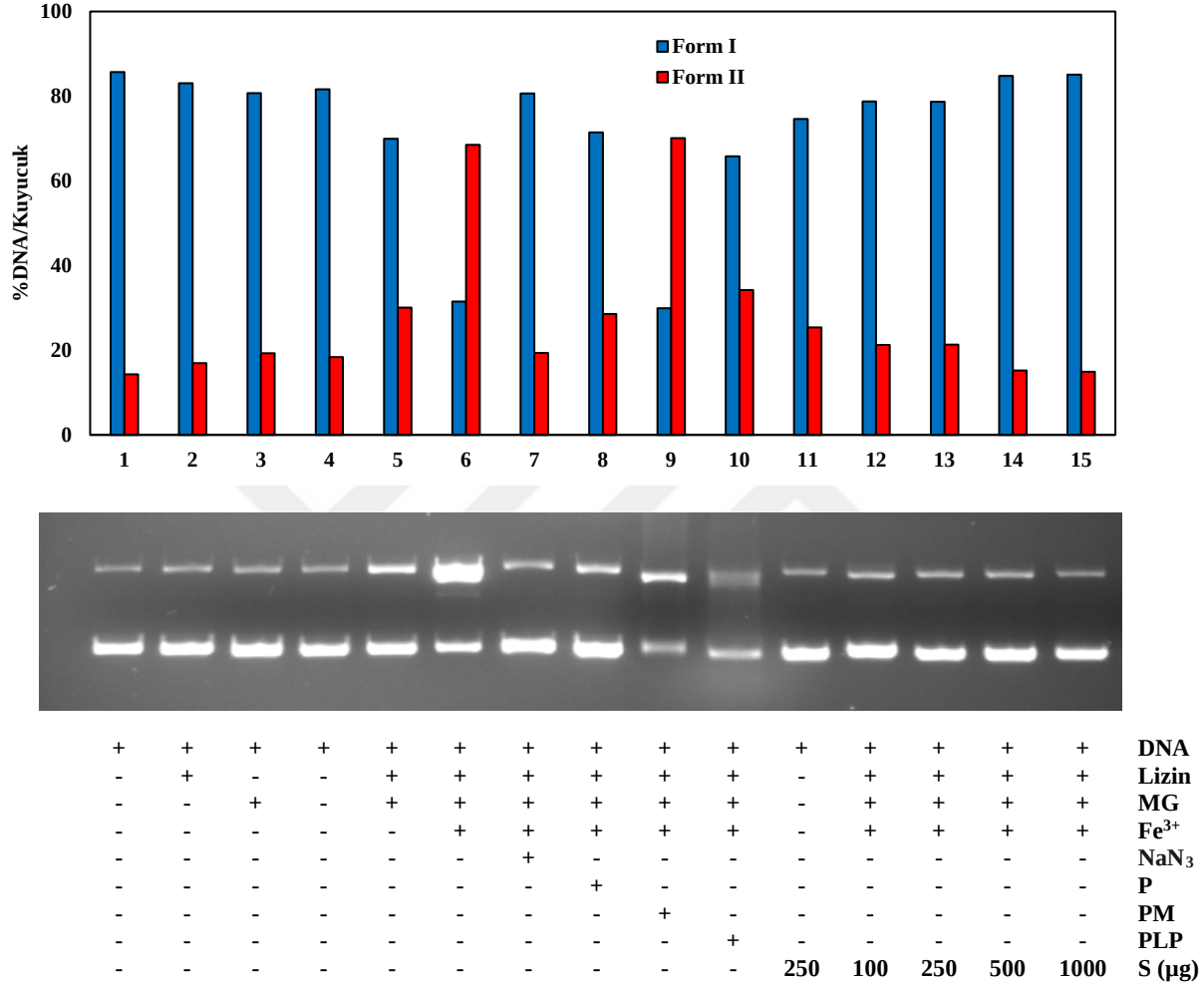
Şekil 4.4.5.2. Fruktoz ile glike proteinin *S. marianum* varlığında SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Fruktoz 0.gün, **3.** BSA+Fruktoz 7.gün, **4.** BSA+Fruktoz 14.gün, **5.** BSA+Fruktoz 21.gün, **6.** BSA+Fruktoz+Sly 0.gün, **7.** BSA+Fruktoz+Sly 7.gün, **8.** BSA+Fruktoz+Sly 14.gün, **9.** BSA+Fruktoz+Sly 21.gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Fruktoz ile glike BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



Şekil 4.4.5.3. Fruktoz ile glike proteinin ticari silmarin varlığında SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Fruktoz 0.gün, **3.** BSA+Fruktoz 7.gün, **4.** BSA+Fruktoz 14.gün, **5.** BSA+Fruktoz 21.gün **6.** BSA+Fruktoz+T-Sly 0.gün, **7.** BSA+Fruktoz+T-Sly 7.gün, **8.** BSA+Fruktoz+T-Sly 14.gün, **9.** BSA+Fruktoz+T-Sly 21.gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Fruktoz ile glike BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.5. *İn Vitro* Olarak DNA'nın Glikasyonu

4.5.1. DNA'nın Lizin ve Metilglioksal ile Glikasyonu



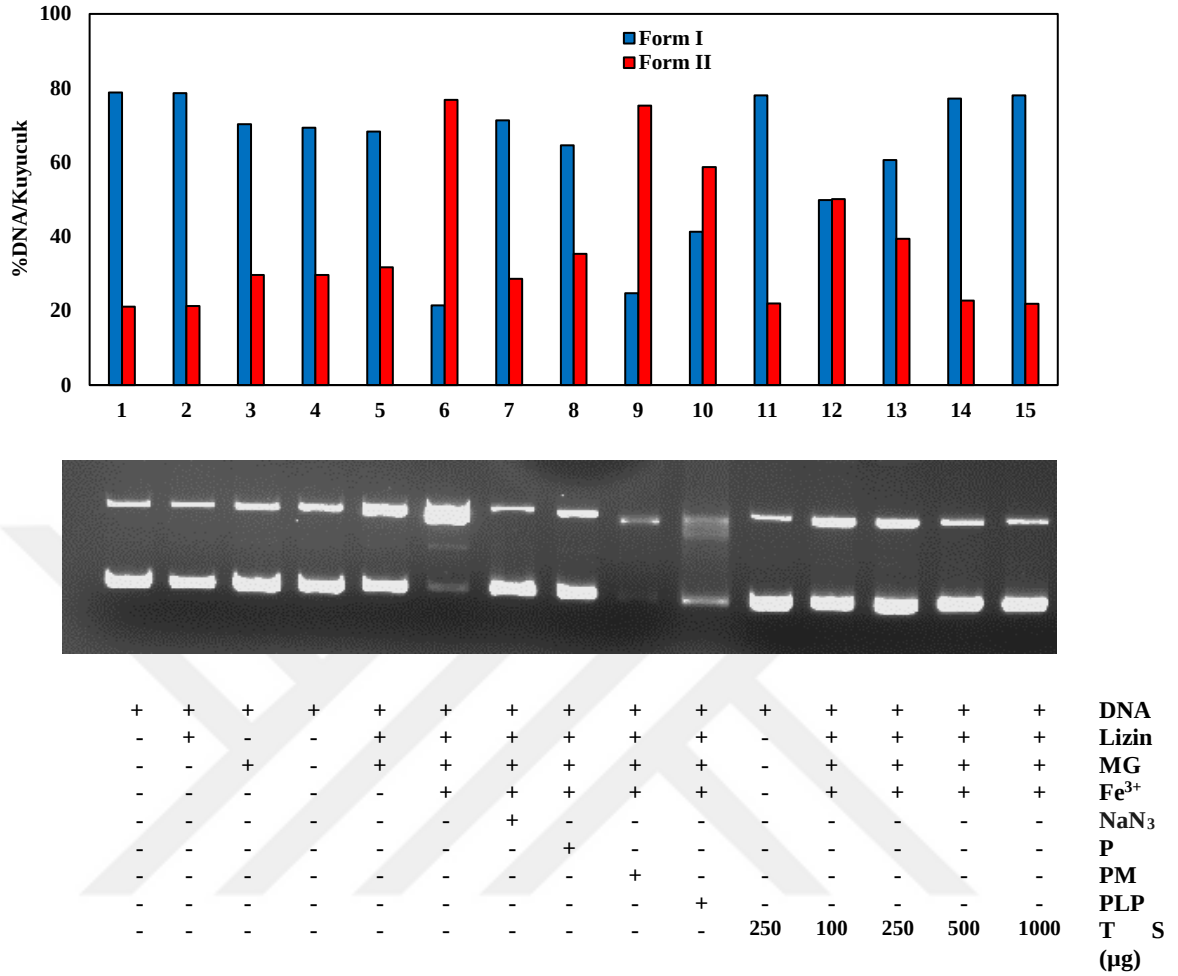
Şekil 4.5.1.1. *S. marianum* bitkisinin etanol:su (1:1) ekstraktının ve B₆ vitamini ile türevlerinin lizin/MG/Fe³⁺ varlığında pBR 322 plazmid DNA'sında oluşturulan hasarın Agaroz Jel Elektroforezi ile önleme etkisinin incelenmesi. Reksiyonlar 37 °C'de gerçekleştirildi. Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 90 dakika 60 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu, BioRad Co.) hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.2. *S. marianum* etanol:su (1:1) ekstraktının ve B₆ vitaminleri ile türevlerinin DNA 'da lizin/MG/Fe⁺³ ile oluşturulan hasarı önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	85,45	14,33	0
2	DNA+Lizin	83,06	16,94	0
3	DNA+MG	80,69	19,31	0
4	DNA+Fe ⁺³	81,64	18,36	0
5	DNA+Lizin+MG	69,97	30,03	0
6	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³	31,52	68,48	0
7	DNA+Sodyum azid+Lizin+MG+Fe ⁺³	80,34	19,16	0
8	DNA+P+Lizin+MG+Fe ⁺³	71,48	28,52	0
9	DNA+PM+Lizin+MG+Fe ⁺³	29,90	70,10	0
10	DNA+PLP+Lizin+MG+Fe ⁺³	65,80	34,20	0
11	DNA+ <i>S. marianum</i> (250 µg/ml)	74,61	25,39	0
12	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³ + <i>S. marianum</i> (100 µg/ml)	78,75	21,25	0
13	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³ + <i>S. marianum</i> (250 µg/ml)	78,71	21,28	0
14	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³ + <i>S. marianum</i> (500 µg/ml)	84,75	15,24	0
15	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³ + <i>S. marianum</i> (1000 µg/ml)	85,07	14,93	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



Şekil 4.5.1.2. Ticari silmarinin etanol:su (1:1) ekstraktının ve B₆ vitamini ile türevlerinin lizin/MG/Fe³⁺ varlığında pBR 322 plazmid DNA'sında oluşturulan hasarın Agaroz Jel Elektroforezi ile önleme etkisinin incelenmesi. Reaksiyonlar 37 °C'de gerçekleştirildi. Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 90 dakika 60 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu, BioRad Co.) hesaplandı.

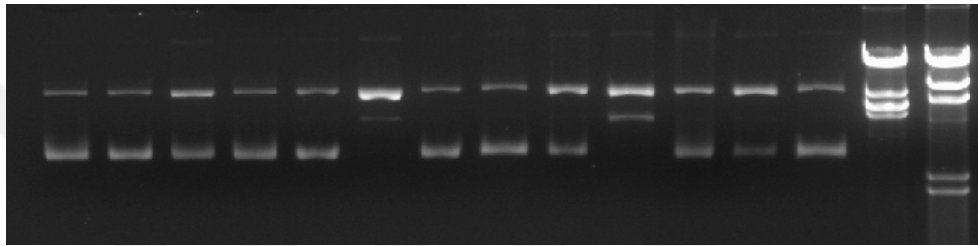
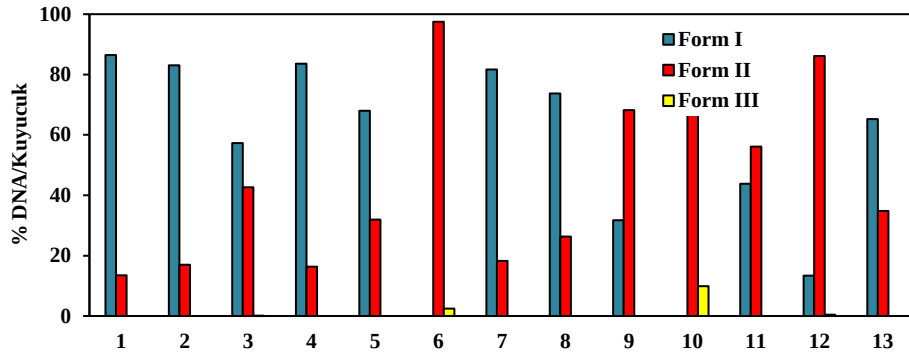
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.3. Ticari silmarinin etanol:su (1:1) ekstraktının ve B₆ vitaminleri ile türevlerinin DNA 'da lizin/MG/Fe⁺³ ile oluşturulan hasarı önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	78,85	21,15	0
2	DNA+Lizin	78,64	21,31	0
3	DNA+MG	70,31	29,69	0
4	DNA+Fe ⁺³	69,30	30,70	0
5	DNA+Lizin+MG	68,27	31,72	0
6	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³	21,44	76,87	1,67
7	DNA+Sodyum azid+Lizin+MG+Fe ⁺³	71,34	28,66	0
8	DNA+P+Lizin+MG+Fe ⁺³	64,62	35,38	0
9	DNA+PM+Lizin+MG+Fe ⁺³	24,72	75,28	0
10	DNA+PLP+Lizin+MG+Fe ⁺³	41,28	58,72	0
11	DNA+T-silmarin (250 µg/ml)	78,01	21,99	0
12	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³ +T- silmarin (100 µg/ml)	49,87	50,13	0
13	DNA+ Lizin+MG+Fe ⁺³ + T-silmarin (250 µg/ml)	60,61	39,38	0
14	DNA+ Lizin+MG+Fe ⁺³ +T-silmarin (500 µg/ml)	77,20	22,80	0
15	DNA+ Lizin+MG+Fe ⁺³ +T-silmarin (1000 µg/ml)	78,09	12,91	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

4.5.2. DNA'nın Şeker ve Şeker Fosfatları ile Glikasyonu



+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	DNA
-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Lizin
-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MG
-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Fe ³⁺
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Glukoz
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Glukoz-6-P
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Riboz
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Riboz-5-P
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Fruktoz
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Fruktoz-6-P
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Fruktoz-1,6-P
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	EcoR1 dig DNA
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Lambda DNA/Hind 3 dig

Şekil 4.5.1.3. PBR 322 plazmid DNA'sında Lizin/MG/Fe³⁺ ile oluşan hasarın ve Lizin/Fe³⁺/Şeker/şeker fosfatları ile oluşan hasar ile kıyaslanmasının Agaroz Jel Elektrophorezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar 37 °C'de gerçekleştirildi. Elektrophorez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 90 dakika 60 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektrophorez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu, BioRad Co.) hesaplandı.

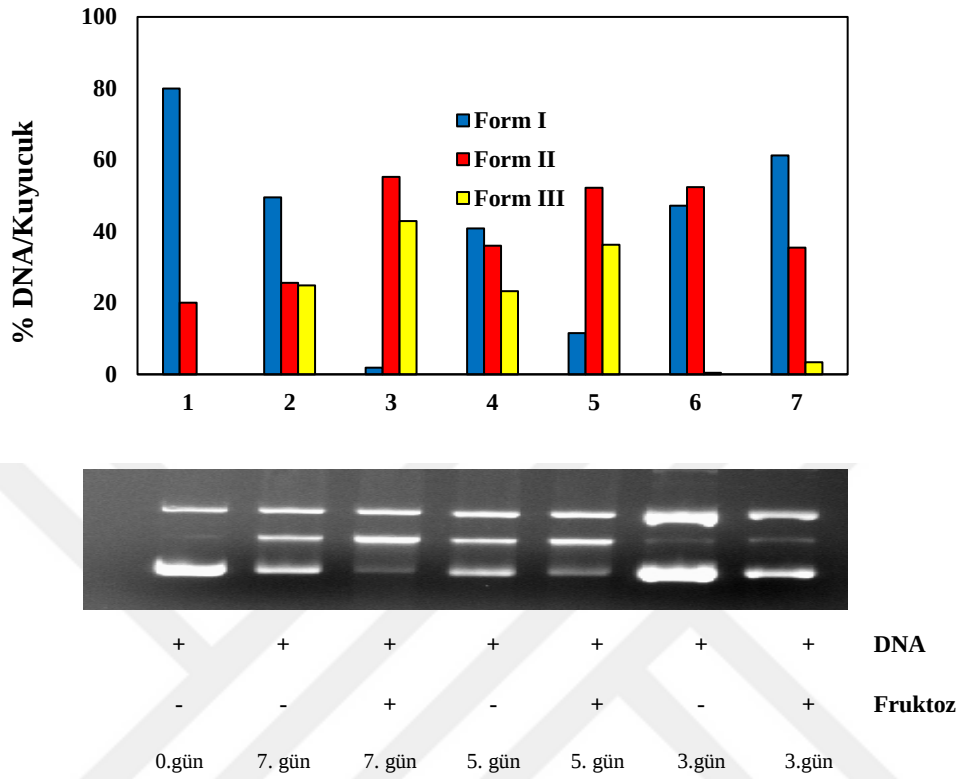
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.4. Şeker ve şeker fosfatlarının DNA’da oluşturduğu hasarın incelenmesi.

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	86,50	13,50	0
2	DNA+Lizin	83,03	16,92	0
3	DNA+Fe ⁺³	57,24	42,63	0,12
4	DNA+MG	83,63	16,37	0
5	DNA+Lizin+Fe ⁺³	68,05	31,95	0
6	DNA+Lizin+MG+Fe ⁺³		97,52	2.48
7	DNA+Lizin+Fe ⁺³ +Glukoz	81,73	18,27	0
8	DNA+Lizin+Fe ⁺³ +Glukoz-6-fosfat	73,72	26,28	0
9	DNA+Lizin+Fe ⁺³ +Riboz	31,76	68,24	0
10	DNA+Lizin+Fe ⁺³ +Riboz-5-fosfat		90,08	9.92
11	DNA+Lizin+Fe ⁺³ +Fruktoz	43,83	56,17	0
12	DNA+Lizin+Fe ⁺³ +Fruktoz-6-fosfat	13,37	86,16	0.46
13	DNA+ Lizin+Fe ⁺³ + Fruktoz-1,6-bisfosfat	65,23	34,77	0
14	EcoR ₁ Digested DNA			
15	Lamda DNA/Hind III digested			

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

4.5.3. DNA'nın Fruktoz ile İnkübasyonu



Şekil 4.5.1.4. PBR 322 plazmid DNA'nın fruktoz ile 0, 3, 5 ve 7 günlük inkübasyonunun Agaroz Jel elektroforezi ile incelenmesi.

Çizelge 4.4. Fruktozun DNA'da meydana getirdiği hasarın etkileri

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA 0.gün	79,95	20,05	0
2	DNA 3.gün	49,55	25,59	24,86
3	DNA+Fruktoz 3.gün	1,85	55,27	42,88
4	DNA 5.gün	40,79	35,97	23,24
5	DNA+Fruktoz 5.gün	11,50	47,2	52,22
6	DNA 7.gün	47,2	52,40	0,40
7	DNA+Fruktoz 7.gün	61,22	35,43	3,35

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerin sağlık ve tıbbi amaçlarla kullanımı insanlık tarihiyle birlikte başlamıştır. Dünyada var olan yaklaşık 250 bin bitki türünden 35-70 bin türün tıbbi amaçlarla kullanıldığı tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık %70-80'i ilk basamak tedavide konvansiyonel olmayan ilaçları tercih etmektedir. Ayrıca gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'ini bitkisel kökenli etken maddeler oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark. 1985).

Bitkisel kaynaklı ilaçlara karşı artan bu ilgi birkaç nedene bağlıdır: Konvansiyonel tedavi ile istenen etkinin görülememesi, sentetik ilaçların yanlış kullanımları sonucu ortaya çıkan yan etkiler, Dünya nüfusunun büyük çoğunluğunun konvansiyonel farmakolojik tedaviye erişme olanağının bulunmaması, bitkilerle tedavinin herhangi bir zararlı etkisinin olmadığı görüşü (Raghavendra ve ark 2009). Sayısız çalışmalar bitkilerin yapılarında bulunan polifenolik bileşiklerin diyabet, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif gibi hastalıkların önlenmesinde çok önemli roller oynadığını göstermektedir.

Diabetes Mellitus (DM), insülin salınımı, insülin etkisi veya bu faktörlerin her ikisinde de bozukluk nedeniyle ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır (Vincent, 2004). Diyabette serbest radikal oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülerek, diyabetiklerin antioksidanlara daha çok ihtiyaç gösterebileceği savunulmuştur. Serbest radikal kaynaklı hasarı önlemede normal düzeylerdeki antioksidan savunma mekanizması yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle doğal eksojen kaynaklı antioksidan kullanımı umut vericidir (Cheesman ve ark. 1993). Bu çalışma ile protein ve DNA glikasyonu sonucu oluşan ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) DNA ve proteinlerde oluşturduğu hasara karşı *Asteraceae* familyasına ait bir bitki olan *S.marianum* (deve diken) bitki tohumunun etanol:su ekstraktının öncelikle antioksidan ve serbest radikalleri söndürme etkisi araştırılmıştır. Daha sonra antiglikasyon etkisi

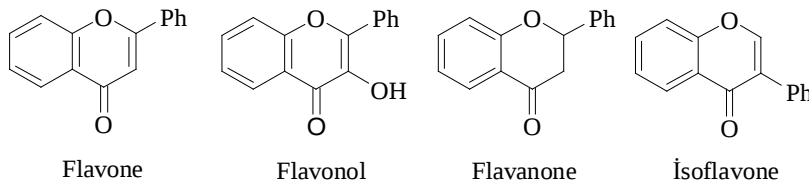
in vitro BSA/Fruktoz model sistemiyle ileri glikasyon son ürünleri olan AGE'ler üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

5.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktarları

Polifenoller; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içeren fitokimyasalların en geniş gruplarından birini oluşturan güçlü antioksidanlardır. Antioksidanlar, ROT'nin oluşumunu engellemek ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri toplayıp, kararlı hale getirerek, zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak, baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak, onarıcı etki ile biyolojik molekülerdeki hasarı onararak, organizmadaki antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etki gösterirler.

Önceki araştırmalar, gıdalardaki fenolik bileşiklerin reaktif karbonilleri temizleyebileceğini ve AGE üretimini engellediğini göstermiştir. Örneğin, yeşil çaydan kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epigallokateşin 3- gallat ve siyah çaydan elde edilen theaflavin 3,3'-digallat farklı protein glikasyon safhalarını engellediği bulunmuştur (Cheng ve ark. 2009).

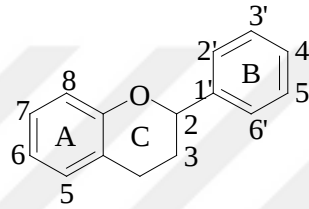
Polifenollerin antioksidan aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Flavonoidlerin antiglikatif etkileri yapı aktivite ilişkileri ile yakından ilgilidir. Genel olarak, flavonlar birkaç istisna dışında flavonoller, flavononlar ve izoflavononlar ile karşılaştırıldığında AGE'lerin oluşumu üzerinde daha güçlü inhibitör etki gösterirler.



Şekil.5.1. Bazı tipik flavonoidlerin yapısı

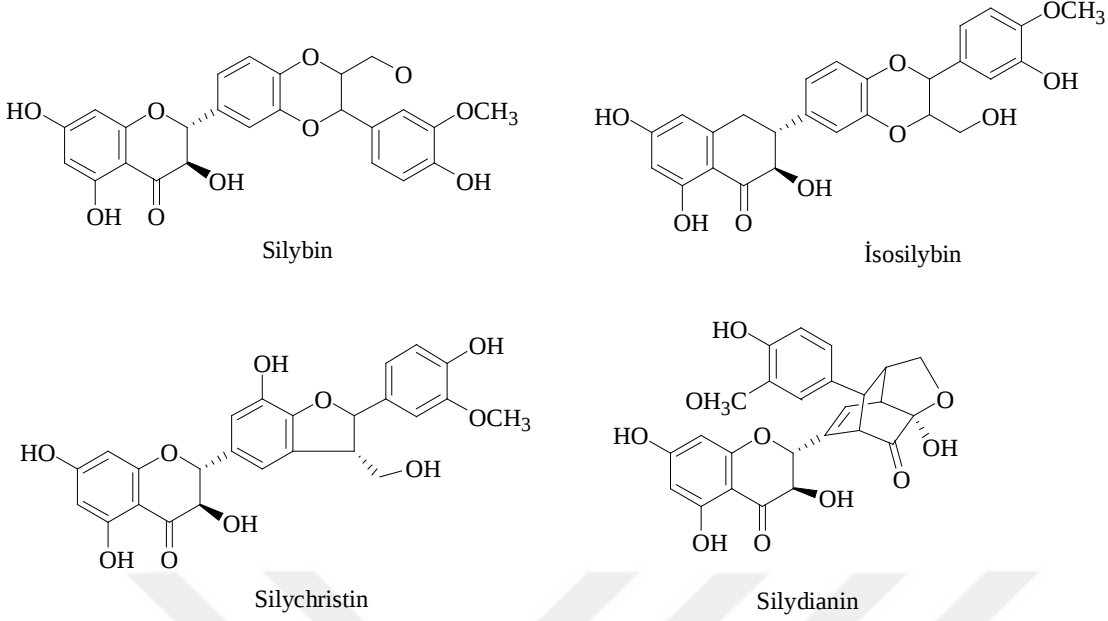
Flavonoidler için fonksiyonel gruplar söz konusu olduğunda, C-3' pozisyonundaki hidroksil grubu AGE oluşumunda inhibitör aktivite içi yararlı iken C-3 pozisyonundaki hidroksil grup şart değildir (Wu ve Yen 2005) (Şekil 5.2.). B halkasının 5' konumundaki tek hidroksil grubu inhibisyon aktivitesine katkıda bulunur (Lou ve

ark. 2001). Hidroksil gruplarının sayısı 3', 4', 5- ve 7'yi içeren pozisyonlarda artığında inhibe edici aktivite buna bağlı olarak kuvvetlenir. Ayrıca bazı pozisyonlarda hidroksil gruplarının metilasyonu ve glikozilasyonu glikasyonda inhibisyon aktivitesini de etkiler. Örneğin, flavonollerin 3-OH grubunun metilasyonu inhibisyon aktivitesinin artmasına neden olur iken C-7 pozisyonundaki hidroksil grubunun glikozilasyonu ve flavonlar, flavonoller ve flavononların 4'-hidroksil gruplarında hidroksil grubunun metilasyon ve glikozilasyonunun inhibisyon aktivitesini azalttığı görülmüştür (Matsuda ve ark. 2003).



Şekil 5.2. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Çalışmada kullanılan *S. marianum* bitki tohumunun etanol:su (1:1) ekstraktının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside, toplam flavonoid bileşen miktarı ise quercetine eşdeğer olarak hesaplandı (Tablo 4.1.). *S. marianum* bitki tohumunun etanol-su ekstraktının 1 mg'nın içerdiği fenolik bileşen 262.70 µg GAE ve flavonoid miktarı ise 10.50 µg QUE eşdeğer olarak hesaplandı. Bulunan bu değerler *S. marianum* bitki tohumunun etanol:su ekstraktının fenolik ve flavonoid bileşen miktarının yüksek olduğunu gösteriyor. Silmarin'in şekil 5.3'deki yapıları dikkate alındığında hidroksil gruplarından dolayı iyi bir radikal söndürücü olduğu söylenebilir.



Şekil 5.3. Silmarin bileşenlerinin temel yapıları

5.2. İndirgeme Gücü Tayini

Bir bileşiğin indirgeme gücü de antioksidan aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar belirli bitki ekstrelerinin indirgeme gücü ve antioksidant aktiviteleri arasında doğrudan bir korelasyon olduğunu gözlemlediler ve gösterdiler (Ferrari ve Torres 2003). Ayrıca, geçiş metallerinin organizmalarda oksijen serbest metallerinin hem başlatılmasında hem de yayılmasında rol oynadığı bildirilmiştir. Demir ve bakır gibi geçiş elementleri, elektron transfer reaksiyonlarına katılabilecek bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içerdiklerinden dolayı oksidasyon reaksiyonlarının güçlü katalizörleridir (Wang ve ark. 2007). Fe^{+3} iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizma olan elektron verebilme yeteneğinin göstergesidir ve diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Serbest radikaller genellikle koroner kalp hastalığı, diyabet, yaşlanma, kanser ve demans dahil olmak üzere biyolojik moleküllerin oksidatif hasarının ana nedeni olarak bilinirler (Ferrari ve Torres 2003). Süperoksit radikallerinin söndürülmesi (ROS'un bir öncüsü olarak hücrel bileşenlere zararlı olarak kabul edilir), antioksidan aktivite mekanizmasını açıklığa kavuşturmanın en önemli yollarından biridir (Je ve Kim 2006).

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktının ortamdaki Fe^{+3} 'ü indirgeme kabiliyeti BHT, BHA ve α - tokoferol ile kıyaslandı.

Bitki ekstraktının indirgeme gücü konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdi. İndirgeme güçleri BHT, BHA ve α -tokoferol standartları ile kıyaslandığında bitki ekstraktının standartlardan daha düşük indirgeme kapasitesine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

Shiwani ve arkadaşları (2012) geleneksel olarak kökleri cilt hastalıkları ve sarılık için kullanılan 200'den fazla türü tespit edilen karabuğday ailesine ait çok yıllık yabani bir otsu bitki olan *Rumex crispus* (koyun ya da Fransız kuzu kulağı)'un saf metanol ve % 80'lik metanol kök ekstraktının DNA ve protein koruma kabiliyetini anti kanser ve serbest radikal söndürme özelliklerini araştırmışlardır. *Rumex crispus*'un 50-800 μ g/ml konsantrasyon aralığında indirgeme gücünü pozitif kontrol olarak BHT ve α -tokoferol kullanarak incelemişler. İndirgeme potansiyellerini artan konsantrasyona bağlı olarak % 80'lik metanol ekstraktında 29.1 ve saf metanol ekstraktında da 29.9 olarak gözlemlemişlerdir.

5.3. ABTS Radikal Katyonunu Söndürme Aktivitesi

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) normal hücrel süreçler, çevresel stresler ve UV ışınlanması ile üretilen yüksek oranda reaktif moleküllerdir. ROS'lar hücrel bileşenler ile reaksiyona girer DNA, karbonhidratlar, proteinler ve lipitlere zarar vererek hücrel ve doku yaralanmasına neden olur. Ayrıca gen ekspresyonunu etkilerler ve de kanser diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların patogeneğinde aktif olarak yer alırlar. Bitki örneklerinin serbest radikal söndürme aktivitesi ABTS radikal katyonunun renk giderme analizi ile belirlenir. Bu yöntemde, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, $ABTS^{\cdot+}$ radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır.

Mesias ve ark. (2014) Arabica ve Robusta çeşitlerinden elde edilen kahve silverskin ekstraktlarının radikal söndürme aktivitelerini 219.9 μ mol TEAC/g ve 225.8 μ mol TEAC/g olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktının ABTS radikalini söndürme aktivitesi 100-300 µg/ml konsantrasyonlarda çalışıldı. Standart olarak BHT kullanıldı. Bitki ekstraktının konsantrasyona bağlı olarak ABTS radikalini söndürdüğü belirlendi. Bitki ekstraktının 300 µg/ml'lik konsantrasyonda % 70.4 pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'nin ise % 91.9 ABTS radikal söndürme aktivitesi olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.).

5.4. *İn Vitro* Olarak BSA'nın Glikasyonu

Non enzimatik glikasyon ile modifiye edilen proteinler biyolojik yarılanma ömürlerinde bir artış, sarı-kahve rengi bir pigmentasyon, molekül ağırlıklarında önemli bir artış, tipik bir floresans spektrumu (örneğin, 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de emisyon), agregasyon ve çapraz bağ oluşumu kabiliyeti, protein yükü ve çözünürlükte değişim, izoelektrik noktada bir azalma, proteolitik bozunmaya ve denatürasyona karşı bir direnç ve kolay bir kimyasal hidroliz gibi fiziksel- kimyasal özelliklerinde önemli değişiklikler gösterirler (Janebova ve ark. 1999, Nass ve ark. 2007).

Glikasyon işleminin izlenme olasılıklarından birisi, proteinlerin yapısal ve katalitik özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen yöntemlerin uygulanmasıdır. Bunlar arasında spektral özellikleri, molekül ağırlığı, yük veya çözünürlükte protein değişikliklerinin araştırılması için uygun spektroskopik (UV-Vis absorpsiyon, floresans, dairesel dikroizim, FTIR) veya elektroforetik (native PAGE, SDS PAGE/western blotting) yöntemler bulunur.

5.4.1. Total AGE Floresans Yoğunluğu

Floresans spektroskopisi, aromatik amino asitlerin varlığı ile ortaya çıkan, proteinlerin kendine özgü floresanslarının neden olduğu proteinleri içeren moleküler etkileşimleri incelemek için güçlü bir yöntemdir. AGE'ler, farklı spektroskopik teknikler ile izlenebilen yapısal varvasyonlara sebep olan çeşitli protein modifikasyonlarına neden olur. Canlı organizmada protein glikasyon reaksiyon ürünlerinin birikimi doku proteinlerinin fonksiyonel modifikasyonuna yol açar (Zhang ve ark. 2009).

Proteinlerdeki baskın floresans grup sırasıyla yaklaşık 295 nm ve 340 nm'de absorpsiyon ve emisyon yapan triptofan kalıntısının indol çekirdeğidir. Triptofanın emisyonu bulunduğu çevreye (örneğin, çözücü polaritesi) karşı oldukça duyarlıdır ve

protein konformasyonel değişiklikleri için haberci bir grup olarak kullanılır. Protein emisyon spektral kaymaları ligandların bağlanması, protein-protein birleşmesi ve protein yayılması da dahil olmak üzere çeşitli olayların bir sonucu olarak gözlemlenir (Lakowicz 2006, Vivian ve Callis 2001).

Protein glikasyonu indirgeyici şekerlerin aldehit veya keton gruplarının proteinlerin serbest amino gruplarına kovalent olarak bağlanmasıyla oluşur. Floresan yoğunluğunun artmasıyla tanımlanabilen AGE'lerin oluşumuna yol açar. 370 nm dalga boyunda uyarılma ve 440 nm dalga boyunda emisyon, floresansta proteinlerdeki maillard ürün seviyesinin *in vitro* ve *in vivo* belirteçleri olarak kullanılır.

Aramsri ve arkadaşları (2015) doğal olarak oluşan bir sinnamik asit türevi olan izoferrulik asitin MG kaynaklı protein oksidasyonu üzerindeki inhibitör etkisini araştırmışlardır. Bunun için 37 °C de BSA+MG, BSA+MG+AG, BSA+MG+İzoferrulik asit reaksiyon karışımını 2 hafta inkübe etmişler oluşan AGE'lerin floresans yoğunluklarını değerlendirmek için 355 ve 460 nm de uyarılma ve emisyonlarını ölçmüşler. MG ile inkübe edilen BSA'nın floresans yoğunluğunun kontrol BSA'ya göre 1.haftada 16 kat 2. Haftada 20 kat arttığını gözlemlemişler. İzoferrulik asitin (1.25-5 mM) 1.haftada % 25.4 ile % 51.6 ve 2.haftada % 27.5 ile %54.9 arasında AGE floresansını azalttığını tespit etmişler. Pozitif kontrol olarak kullanılan AG (1.25 mM) ise MG kaynaklı AGE'lerin tamamını inhibe ettiğini saptamışlar.

Glikasyon süreci, ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) olarak adlandırılan geri dönüşümsüz heterojen yan ürünlerin üretilmesine yol açan çeşitli protein türleri ve kimyasal modifikasyona sebep olur. AGE'lerin floresans özelliğine dayanarak *S. marianum* bitki tohumunun etanol:su ekstraktı ve ticari silmarin ekstraktı BSA/fruktoz sistemi ile 37 °C'de 21 gün inkübe edildi ve bu ekstraktın toplam AGE'lerin oluşumu üzerindeki etkisi araştırıldı. Pozitif kontrol olarak Aminoguanidin kullanıldı. İnkübasyon süresi arttıkça floresans yoğunluğunda artış olduğu gözlemlendi.

S. marianum, ticari silmarinin ve pozitif kontrol olarak kullanılan Aminoguanidin'in 500 µg/ml lik konsantrasyonlarında BSA/fruktoz glikasyon sisteminde total AGE inhibisyonu yüzdesi sırasıyla 7. gün: % 92.57, 14. gün: % 95.06, 21. gün : % 98.82, ticari silmarin ekstraktının total AGE inhibisyon yüzdesi ise 7. gün:

% 95.52, 14. gün: % 98.17, 21. gün: % 98.73, pozitif kontrol Aminoguanidin'in total AGE inhibisyon yüzdesi ise 7. gün: % 74.04, 14. gün: % 78.29, 21. gün: % 81.83 olarak hesaplandı.

Flavonoidler; bitkilerin sekonder metabolitleri arasında biyolojik etkilerinden dolayı en önemli bileşik sınıflarından birisidir. Son zamanlarda yürütülen araştırmalar, bazı flavonoidlerin superoksit (Bors ve ark. 1990) ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını (Yuting ve ark. 1990), lipid peroksil radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. (Javanovic ve ark. 1994). *S. marianum* flavonoid sınıfı bir bileşiktir ve glikasyonda artan serbest radikalleri süpürme, metal şelasyonu ve reaktif dikarbonil bileşiklerini yakalama mekanizmaları ile glikasyonu önlediği söylenebilir.

5.4.2. Fruktozamin Testi

NBT indirgeme testi, süperoksit anyonlarının üretimini tespit etmek için kullanılır. NBT süperoksidi absorbe edebilen ve rengi mora dönüştürebilen bir reaktiftir.

Glikasyonun erken safhalarında, kararsız shiff bazları oluşur ve klinik olarak diyabetik hastalarda kısa süreli kan şekeri kontrolü için indikatör olarak kullanılan fruktozamin gibi Amadori ürünlerine dönüştürülür (Ardestani ve Yazdanparast 2007). Dolayısıyla fruktozamini düşürmek diyabetik komplikasyonları geciktirmek için terapötik bir yöntemdir (Shield ve ark. 1994).

Glikasyonun erken safhasında, shiff bazları oksidasyona, serbest radikallere, reaktif karbonil gruplarına ve AGE oluşumuna yatkın olurlar. Birçok antioksidan içeren gıda ve bitkilerin, glikasyon işlemi sırasında oluşan serbest radikalleri söndürebilmenin yanı sıra indirgen şekerlerin ve amadori ürünlerinin kendiliğinden oksidasyonunu önleyerek AGE oluşumunu inhibe eder.

Günümüzde diyabette protein glikasyonunu doğrudan inhibe edebilen ve diyabetik komplikasyonların ilerlemesini yavaşlatan FDA onaylı bir ilaç yoktur. Protein glikasyonunu farmakolojik olarak durdurmanın tek yolu, plazma glukoz seviyesini düşürmektir. Maalesef birçok ilaç tedavisi seçeneği ile bile birçok şeker hastasının plazma glukoz konsantrasyonunu normal seviyelerde tutamıyor, bu da glikasyon

oranının artmasına sebep olur. Bu nedenle polifenolik bileşikler, glikasyon işlemini yavaşlatmak için başka bir yaklaşım öneriyor.

Nagasawa ve arkadaşları (2003) diyabetik bir sıçan çalışmasında bu kavramı gösterdiler. Bu hayvanların plazma ve böbreklerinde protein glikasyonu üzerine G-rutin'in etkisini araştırdılar. Bir ay sonra, G-rutin ile tedavi edilen sıçanların serum ve böbrekteki glikasyon ürünlerinde daha düşük bir içeriğe sahip olduğunu saptadılar.

BSA/fruktoz glikasyon modelinde amadori ürünlerinin oluşumunun 0, 7, 14 ve 21. günlerde inkübasyon süresine (gün) bağlı olarak absorbans değerlerinin gittikçe arttığı ve NBT'nin oluşan amadori ürünlerini indirgememesinin de zamana bağlı olarak artış gösterdiği gözlemlendi.

S. marianum, ticari silmarin ve pozitif kontrol olarak kullanılan Aminoguanidin'in fruktozamin oluşumunun 21. gününde sırasıyla 500 µg/ml konsantrasyonda % 41.01, % 69.24 ve % 69.76 inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.4.2.1 ve Şekil 4.4.2.2).

5.4.3. α -Dikarbonil Oluşumunun İnhibisyonu

Glikasyon veya bazal metabolizma (yağ asitlerinin β -oksidasyonu) esnasında *in vivo* olarak oluşturulan α -dikarbonil bileşikleri çok güçlü glikasyon ajanlarıdır. Bu bileşiklerin proteinlerde geri dönüşümsüz değişimlerden sorumlu olan, oksidatif stres ve hücre apoptozu oluşturabilen moleküller içi ve moleküller arası çapraz bağların oluşmasında temel maddeler olduğu düşünülmektedir. α -dikarbonillerin aşırı üretilmesi insan vücudunda onların birikmesine yol açabilir ve karbonil stres olarak adlandırılır.

α -dikarbonil bileşikleri ya glukozun degradasyonu ya da erken glikasyon ürünleri ile endojen olarak üretilen AGE'lerin önemli öncüleri olarak bilinir. Batı diyetinde fruktozun artan seviyeleri serum MGO ve GO artışı ile ilişkilendirilmiştir (Lee ve ark. 2009). Yüksek fruktozlu beslenme dokularda aldehit oluşumunu artırabilir. Bu aldehitlerin karbonil karbonu fonksiyonel enzimlerin serbest amino grupları ve shiff bazını oluşturan membran proteinlerinin işlevlerini değiştiren sonraki floresan adüktleri ile kolayca reaksiyona girer. Yüksek fruktoz diyeti, serbest radikal savunma sistemi üzerinde hasar meydana getirir.

Bazı polifenoller, dikarbonillerin proteinlerin amino gruplarına bağlanmasını önleyerek glikasyonun sonraki safhasını inhibe eder (Sang ve ark. 2007). Verzelloni ve arkadaşları (2011) fenolik bileşiklerin albümine spesifik bağlanmaları nedeniyle Amadori ürünlerinin oluşumunu inhibe edeceğini ileri sürmüştür. Dikarboniller, doğrudan AGE'leri oluşturan proteinleri çapraz bağlayabilir ve bu *in vivo* olarak tespit edilmiştir.

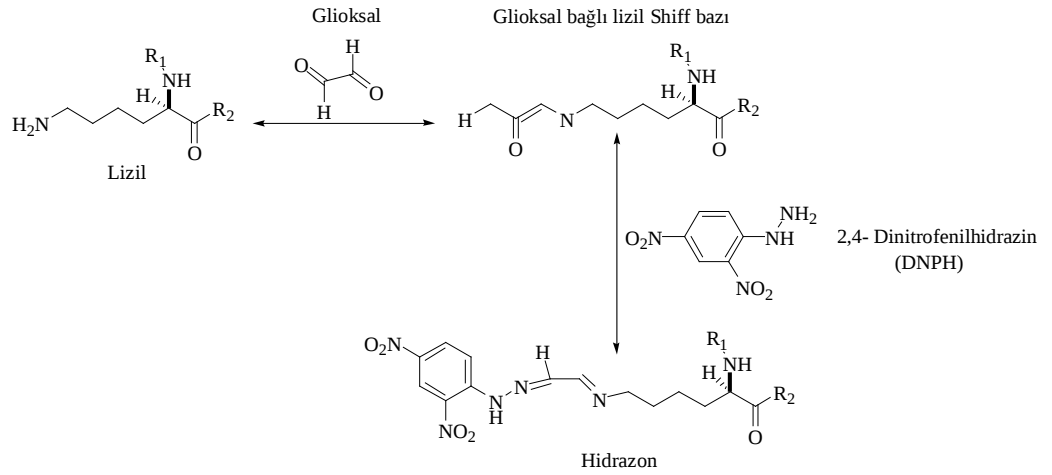
Son zamanlarda ilgi antioksidanlar, metal şelat iyonları veya doğrudan MG tuzağı gibi davranan fitokimyasal bileşiklerden AGE inhibitörlerinin tanınmasına odaklanmıştır. Bu bağlamda AGE inhibitörlerinin uygulanması, AGE ile ilişkili hastalıkların ortaya çıkmasını azaltmak için yeni bir strateji olarak ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız *S. marianum* bitkisinin antioksidan ve hepatoprotektif ajan olarak etkili olduğu iyi bilinir. BSA/fruktoz sisteminde 21.günde α -dikarbonil bileşiklerini *S. marianum*, ticari silmarin ve pozitif kontrol olarak kullanılan Aminoguanidin'nin inhibisyon değerleri 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda sırasıyla % 39.5, % 36.6 ve % 55.3 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.3.1, Şekil 4.4.3.2 ve Şekil 4.4.3.3.). Sonuç olarak silmarin bir AGE inhibitör adayı olabilir.

5.4.4. Protein Karbonil Miktar Tayini

Protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların renk şiddetinin ölçülmesine dayanır (Şekil.5.4.). Protein karbonil içeriği oksidatif hasarın bir belirticidir. Glikasyon reaksiyonları ile protein hasarının muhtemel mekanizması serbest radikallerin üretilmesine dayandırılır.

In vitro deneyler yakın zamanda proteinin MG ile glikasyon reaksiyonu sırasında reaktif oksijen türlerinin üretildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar tiyol içeren proteinin tükenmesine ve protein karbonil oluşumunda bir artışa sebep olur.



Şekil 5.4. lysly ve glioksal ile protein karbonilasyonunun DNPH ile belirlenmesi. (R₁ ve R₂ diğer proteinlerdir)

ROT üretimi, protein amino asit kalıntılarının oksidasyonuna neden olarak bir karbonil türevi oluşturur ve tiyol gruplarını ortadan kaldırarak proteinin oksidatif savunmasını azaltır. AGE'lerin *in vivo* oluşumu, bazı kronik hastalıkların, özellikle de diyabetik komplikasyonların patogeneğinde rol oynadığından, AGE inhibitörlerinin keşfi ve araştırılması, diyabetik veya diğer patojenik komplikasyonların önlenmesi için potansiyel bir terapötik yaklaşım sunacaktır. Şimdiye kadar, bazı potansiyel AGE inhibitörleri önerilmiş ve bunların birçoğu klinik çalışmaların fazına ulaşmıştır.

Temel olarak, AGE inhibitörleri iki gruba ayrılabilir: sentetik bileşikler ve doğal ürünler. Genel olarak, AGE inhibitörlerinin altında yatan inhibe edici mekanizmaları temel olarak proteinlere şeker bağlanması engellenmesi, glikooksidasyon sürecinde üretilen reaktif dikarboniller, serbest radikaller ve azot türleri dahil olmak üzere bazı ara maddelerin yakalanması veya atılması yoluyla glikooksidasyon ve oksidatif stresin azaltılması ve oluşan AGE çapraz bağlanmalarını yıkmaktır.

Kahve tüketimi tip 2 diyabet gibi kronik hastalık riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir. Kahve, AGE'lerin potansiyel bir doğal önleyici kaynağı olarak önerilmiştir. Verzolloni ve arkadaşları (2011) kahve melanonoidlerinin glikasyonun Amadori sonrası evresinde bir radikal süpürücü ve bir Fe-şelatör olarak hareket ederek AGE oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir.

Hiperglisemi, oksidatif hasara ve reaktif oksijen türleri ile antioksidan detoksifikasyon yolları arasında dengesizliğe sebep olur (Wen ve ark. 2002). Fenolik ve flavonoid bileşiklerin çoğunun faydalı sağlık yararları sağladığı mekanizma serbest radikalleri temizlemektir. Fenolik ve flavonoid bileşiklerin biyoaktivitesi, antioksidan özellikleri ile (serbest radikalleri süpürme kabiliyeti) korelasyona sahiptirler.

S. marianum bitkisinin aktivitesi flavolignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan gibi davranması ve buna bağlı olarak serbest radikal önleyici etki göstermesine dayandırılır (De Groot ve Rauwen 1998). Çalışmamızda BSA/fruktoz sisteminde *S. marianum* bitki ekstraktının ve pozitif kontrol olarak kullanılan Aminoguanidin ile ticari silmarinin protein karbonil oluşumu üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir (Şekil 4.4.4.1, Şekil 4.4.4.2).

5.4.5. Glikolizlenmiş Protein SDS-PAGE Karakterizasyonu

SDS-PAGE yaygın olarak bir proteinin moleküler boyutunu tahmin etmek için kullanılır. BSA, lizin (% 59) ve arjinin kalıntıları (% 23) bakımından zengin 66.7 KDa'lık bir proteindir. *In vivo* olarak albümin arjinin, lizin ve sistein kalıntılarından glikatlanırlar (Rondeau ve Bourdon 2011). Albumin serumdaki bolluk nedeni ile glikasyon reaksiyonu için hedef bir proteindir. Albuminin üçüncül yapısı, metal iyonları, yağ asitleri, bilirubin ve çeşitli farmasötik ajanlar gibi küçük moleküllere bağlanmasını sağlar (Wautier ve Guillausseau 2001). Uzun yarı ömrü ve kan plazmasındaki yüksek konsantrasyonu nedeni ile albümin, karbonhidratların enzimatik olmayan modifikasyonuna duyarlıdır. Birçok yapısal modifikasyon, molekül ağırlığında bir artış da dahil olmak üzere albüminin glikasyonu sonucunda ortaya çıkar. Molekül ağırlığındaki bu artış arjinin, lizin ve sistein gibi bazı amino asit kalıntılarına bağlı bir veya birkaç glukoz birimine ve nihayetinde albümin moleküllerinin çapraz bağlanmasına bağlanabilir. Glikooksidasyonun sebep olduğu, albümin yapısal modifikasyonları moleküler ağırlığın artmasına ve hidrofobik bölgelerin çözücüye daha fazla maruz kalmasına yol açar (Rondeau ve Bourdon 2011).

Güçlendirilmiş inhibisyon aktivitesi ve azaltılmış toksisite ile doğal kaynaklı yeni potansiyel antiglikasyon ajanların keşfi, diyabetik komplikasyonların gelişimi ve önlenmesinde etkili bir yaklaşımdır. Flavonoidler albümine (ve diğer proteinlere) bağlanır ve bu bağlanma, glikooksidasyona karşı koruyucu etkinliğini artırır.

BSA/fruktoz sisteminde inkübe edilen örnekler SDS-PAGE protein jel elektroforezi uygulandı. Glikolizlenmiş BSA bandı jelde 97 kDa civarında gözlemlendi. İnkübasyon süresi (gün) arttıkça bant yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. Her bantın yoğunluğu glikasyona uğramış BSA bandının yoğunluğunun, orijinal BSA bant yoğunluğuna oranıyla tespit edildi (fru-BSA/ori BSA). *S. marianum* ve ticari silmarinin ekstraktlarının glikolizlenmiş BSA bant yoğunluğunu azalttığı gözlemlendi. Pozitif kontrol AG güçlü inhibisyon etki gösterdi.

5.4.6. *In Vitro* Olarak DNA'nın Glikasyonu

5.4.6.1. DNA'nın Lizin ve Metilglioksal ile Glikasyonu

Çeşitli kanıtlar, lizin ve MG arasındaki reaksiyonun süperoksit ve hidroksil radikallerinin üretilebileceğini göstermektedir (Kang 2003). Proteinlerin önemli bir bileşeni olan lizin, enzim aktif bölgelerinin bir parçasıdır ve katalizde kritik roller oynamaktadır. Aynı zamanda, enzimatik olmayan şeker tutunması ve onu takip glikasyon son ürünler (AGE'ler) oluşturulması için tercih edilen gruptur. Biyolojik sistemlerde bulunan bakır ve demir gibi eser metaller, H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikali üretir ve daha sonra DNA iplikçik kırılmasına neden olabilir. Önceki çalışmalar demir varlığında MG'nin lizin ile reaksiyonu ile DNA kesimini tetiklediğini göstermiştir (Kang 2003).

Jung Hoon Kang (2004) güçlü bir antioksidan ve β -alanin-L-histidin aminoasitlerinin bir kombinasyonu olan doğal olarak iskelet kası, kalp, karaciğer, böbrek ve yüksek konsantrasyonlarda da beyin ve diğer dokularda bulunan karnozin ve onunla ilgili olan anzerin ve homokarnozinin Fe^{+3} varlığında ve yokluğunda MG ve lizinin glikasyon reaksiyonu ile indüklenen DNA hasarının üzerine koruyucu etkilerini araştırmışlar. pUC 19 plazmid DNA kullanarak lizin/MG ve Fe^{+3} ün varlığında ve yokluğunda karnozin, anzerin ve homokarnozini farklı konsantrasyonlarda kullanarak reaksiyon karışımını 37 °C de 2 saat inkübasyona bırakıp sonra -80 °C de reaksiyonu durdurup elektroforez ile örnekleri analiz etmişler. Anzerinin DNA hasarını karnozin ve homokarnozinden daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini gözlemlemişler.

Pridoksamin, birkaç metabolik hücresel yolların koenzimleri olarak bilinen bir grup vitaminlerin B vitaminleri ailesine sahip olan bir B₆ vitamin türevidir.

Pridoksamin, glikatlanmış proteinlerden AGE'lerin oluşumunu ve AGE'lerin oluşumunda ara maddeler olan patojenik reaktif karbonil bileşikler yakalamak suretiyle inhibe eder (Turgut ve Bolton 2010).

Nakamura ve arkadaşları (2007). Aktif bir B₆ vitamini formu olan pridoksal-5-fosfat (PLP)'nin ileri glikasyon son ürünleri olan AGE'lerin oluşumunu engellediğini gösterdiler. Diyabetik sıçanlarda PLP'nin nefropati üzerine faydalı etkileri olup olmadığını göstermek amacıyla streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlara 16 hafta süreyle 600 mg/kg/günlük bir dozda PLP ve PM (Pridoksamin) oral olarak verdiler. PLP verilen sıçanlarda diyabet olanlara kıyasla albüminüri, glomerüler hipertrofi, mezangial genişleme ve intestisyel fibrozu önemli ölçüde inhibe ettiğini PM'nin ise bir etkisi olmadığını tespit ettiler. Böylece PLP'nin STZ kaynaklı diyabetik sıçanlarda AGE'lerin oluşumunu inhibe ederek nefropatinin ilerlemesini engellediğini ileri sürdüler.

Birçok hastalığın oluşması ve patolojik durumun ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli rolü vardır. Serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Çalışmamızda DNA/lizin/MG /Fe⁺³ sistemiyle oluşan oksidatif DNA hasarının *S. marianum* bitki tohumunun etanol ekstratının koruyucu etkisi araştırıldı. Pozitif kontrol olarak ticari silmarin ve Pridoksin, pridoksal 5-fosfat ve pridoksamin vitaminleri kullanıldı. DNA/lizin/Fe⁺³ reaksiyon karışımına MG eklendiğinde DNA hasarının çarpıcı bir şekilde arttığını gözlemledik (Şekil 4.5.1.2.). MG ile lizin arasındaki reaksiyon süperoksit ve hidroksil radikallerini üretir. DNA'nın korunmasında süperoksit ve hidroksil radikallerinin üretiminin inhibe edilmesi arasında güçlü bir korelasyon vardır. *S. marianum* bitki tohumunun etanol ekstratının ve ticari silmarinin çok da konsantrasyona bağlı olmadan oksidatif DNA hasarını inhibe ettiğini ve vitaminlerin PLP>P>PM olarak glikasyon kaynaklı DNA hasarını koruma etkisi gösterdiklerini gözlemledik.

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan ve antoksidan özellik taşıyan polifenolik bileşiklerdir. *S. marianum* (devediken) tohumundan elde edilen ekstratlar bol miktarda silmarin içerir. Silmarin dört flavonolignan izomerin yani silybin, izosilybin, silydianin ve silychristinin kompleks bir karışımıdır ve antiglikatif etki gösterir. Burada sunduğumuz sonuçlar hiperglisemik koşullar altında oksidatif DNA

hasarının geçiş metalleri ve MG varlığında ileri glikasyon son ürünleri tarafından indüklenebileceğini ve diyabet ve diyabetik komplikasyonlarda görülen geri dönüşümsüz bozulmalara neden olabileceğini bize göstermektedir.

5.4.6.2. DNA'nın Şeker ve Şeker Fosfatları ile Glikasyonu

Glikasyon, protein, DNA ve lipidlerin amino grubuna aldehit veya keton şeker ilavesiyle başlatılan enzimatik olmayan reaksiyondur. Diyabet, katarakt, Alzheimer's, Ateroskleroz, Parkinson's ve fizyolojik yaşlanma gibi çeşitli hastalıklarla ile yakından ilişkilidir. Nükleik asitlerin ve nükleotidlerin yapılarında bulunan adenin, guanin ve sitozin bazları serbest amino grubu içerdiklerinden glikasyon tepkimesine açıktırlar. DNA bazları ile oluşan glikasyon ürünüdeki N-glikozidik bağ kararlı değildir, hidroliz ile ayrılır ve apürinik DNA bölgeleri oluşur ve kısmen DNA onarım mekanizmasıyla onarılır. Aminoasitler ve metilglioksal arasındaki glikasyon reaksiyonunun reaktif oksijen türleri oluşturduğu rapor edilmiştir (Yim ve ark. 1995 Ortwerh ve ark. 1998).

Levi ve Werman (2001) pBR 322 Plazmid DNA'sını çeşitli inkübasyon periyotları için birkaç indirgeyici şeker (fruktoz, fruktoz 1-fosfat, fruktoz 6-fosfat, glikoz 1-fosfat, glikoz 6-fosfat, glikoz) ile *in vitro* olarak 3, 6, 9, 12 ve 15 gün boyunca, 37 ° C'de karanlıkta steril koşullar altında ile inkübe ettiler. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit kullandılar. İndirgeyici şekerler ile muamele edilmiş pBR 322 DNA, süper sarılmış DNA formunun ayrılmasını sağlayan koşullar altında jel elektroforezine tabi tuttular. İnkübasyon sırasında oluşan DNA modifikasyonları ve hasarlarını agaroz jel elektroforezi ile değerlendirdiler. Test edilen şekerlerin değiştirilme ve 15 gün boyunca inkübasyonundan sonra DNA'ya zarar verme yoğunluğu aşağıdaki sırayla önemli ölçüde arttığını gözlemlediler. Glukoz 1-fosfat< glukoz<glukoz 6-fosfat<fruktoz 1-fosfat<fruktoz<fruktoz-6-fosfat. Veriler, fruktozun glikasyonu etkileyebilecek ve fizyolojik komplikasyonlara neden olabilecek bir faktör olarak daha fazla dikkat etmesi gerektiğini öne sürmektedir.

Çalışmamızda şeker ve şeker fosfatlarının DNA da oluşturduğu hasarı göstermek amacıyla şeker ve şeker fosfatları ile pBR 322 Plazmid DNA'sı kullanılarak DNA/lizin/MG/Fe⁺³ reaksiyon sistemine şeker ve şeker fosfatlarının ilavesiyle 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra bu karışım -20 °C de 60

dakika dondurularak reaksiyon durduruldu. Oluşan DNA hasarı Agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

Şeker ve şeker fosfatlarının meydana getirdiği DNA hasarı Riboz-5-fosfat>Fruktoz-6-fosfat>Riboz>Fruktoz>Fruktoz-1,6-bisfosfat>Glukoz-6-fosfat>Glukoz sıralamasını takip etti. DNA'da lizin/MG/Fe⁺³ ile oluşturulan hasarın ise şeker ve şeker fosfatlarından dolayı oluşan hasardan daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.1.3). Bu çalışma bize riboz-5-fosfat ile fruktoz ve fosfat metabolitlerinin *in vitro* koşullarda glukoz ve fosfat metabolitlerinden daha hızlı DNA'yı değiştirebildiğine dair kanıt sağlar.

5.4.6.3. DNA'nın Fruktoz ile İnkübasyonu

Şimdiye kadar, birçok çalışma, glikoz ve proteinler arasındaki enzimatik olmayan reaksiyona odaklanmıştır. Daha hızlı bir glikasyon maddesi olan fruktoz ile reaksiyon sadece küçük bir dikkat çekmiştir. Ancak fruktoz ve fruktoz-3-fosfat, *in vitro* olarak glukozdan daha güçlü ve hızlı glikatlayıcı ajandır. Reaktif tür olan asiklik (açık zincir) formun popülasyonu fruktozda glukozdan yaklaşık 10 kat daha fazladır (Bunn ve Higgins 1981).

Yüksek fruktoz diyeti, serbest radikal savunma sistemi üzerinde bir hasar meydana getirir (Shinozak ve ark. 2000). İnkübasyon zamanına bağlı olarak fruktoz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerini inhibe edebilir (Zhao ve ark. 2000). Yüksek fruktozlu beslenme dokularda aldehit oluşumunu arttırabilir (Vasdey ve ark.1998). Bu aldehitlerin karbonil karbonu fonksiyonel enzimlerin serbest amino grupları ve Schiff bazını oluşturan membran proteinleri ve işlevlerini değiştiren sonraki floresan adüktleri ile kolayca reaksiyona girer. Fruktoz, *in vitro* koşullar altında serbest radikalleri üretebilir ve plazmid DNA'nın modifikasyonlarına ve hasarına neden olabilir (Levi ve Werman 2001).

Çalışmamızda fruktozun DNA'ya olan hasarını incelemek için DNA/fuktoz sistemiyle karanlık ve steril ortamda 37 °C de 3, 5 ve 7 gün inkübe edilen reaksiyon karışımının DNA'da oluşturduğu hasar jel elektroforez yöntemi ile incelendi. DNA hasarının 3. ve 5. günlerde DNA da hasarın indikatörü olan liner formu temsil eden bantların belirgin bir şekilde oluştuğunu gözlemledik (Şekil 4.5.1.4.).

Waris ve arkadaşları (2010) çevredeki riboz konsantrasyonlarındaki değişikliklerin DNA'da kayda değer modifikasyonlara yol açabileceğini incelemek amacıyla pBR 322 plazmid DNA'sına riboz (0.4 M) ilave edilip karanlık ve steril ortamda 37 °C de 24 saat inkübe etmişler. Bununla birlikte, 37 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra, bir miktar DNA örneğini etanol çözeltisine tabi tutmuşlar ve fazla ribozu uzaklaştırmak için etanol ile iyice yıkamışlar. Yıkanmış DNA Tris-HCl tamponuyla yeniden süspanse edililerek 37 °C de inkübe edilmiş. Hem fazla şekeri uzaklaştırılmış örneklerden hem de kesintisiz olarak riboz ile inkübe edilen reaksiyon karışımlarından 0, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak agaroz jel elektroforezi ile ribozun plazmid DNA hasarını incelemişler. Kesintisiz olarak devam eden DNA/riboz örneklerine göre DNA'dan fazla ribozu uzaklaştırmak için 24 saat inkübasyonundan sonra etanol ile yıkanan örneklerin agaroz jel elektroforez sonuçlarında zamana bağlı olarak doğrusal plazmid formunu temsil eden bir soluk bandın da ortaya çıktığını liner formunu temsil eden bu bandın, 7 gün boyunca inkübasyona devam edildiğinde yoğunlukta da arttığını gözlemlemişler.

Günümüzde kişi başına ortalama 10 ile 30 çay kaşığı, bir başka deyişle 40-120 gram şeker tüketildiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuş. Ancak Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre; şekerin günlük kalori ihtiyacımızın yüzde 10'undan fazlasını oluşturmaması gerekiyor. Çünkü fazla şekeri vücut tolere edemiyor ve şeker zamanla birikim yaparak birçok ciddi sağlık sorununa neden olabiliyor. Bu bağlamda; çalışmamız fruktozun DNA'ya olan hasarının bir kanıtını sunmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Abordo, E. A., Minhas, H. S., and Thornalley, P. J. 1999. Accumulation of Alphaoxoaldehydes During Oxidative Stress: A Role in Cytotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 58: 641-648.
- Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, RP., Agarwal, BB. 2006. Anticancer Potential of Silmarin: from Bench to Bed Side. *Anticancer Research*, 26(6B): 4457-98
- Ahmad, M. S., Pischetsrieder, M. and Ahmed, N. 2007. Aged Garlic Extract and S-allyl Cysteine Prevent Formation of Advanced Glycation end Products. *European Journal of Pharmacology*, 561: 32-38.
- Ahmed, N. 2005. Advanced Glycation end Products-Role in Pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67: 3-21.
- Ames, J. 2008. Determination of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in Foods and Related Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126: 20-24.
- Angermuller, S., Islinger, M., and Volkl, A. 2009. Peroxisomes and Reactive Oxygen Species, A Lasting Challenge. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(4): 459-463.
- Ardestani A, Yazdanparast R. 2007. Cyperus Rotundus Suppresses AGE Formation and Protein Oxidation in A Model of Fructose-Mediated Protein Glycooxidation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41: 572-578.
- Argirova, M. and Argirov, O. 2003. Inhibition of Ascorbic Acid-Induced Modifications in Lens Proteins by Peptides. *Journal of Peptide Science*, 9: 170-176.
- Babu, P. V., Sabitha, K. E. & Shyamaladevi, C. S. 2006. Therapeutic Effect of Green Tea Extract on Advanced Glycation and Cross-linking of Collagen in The Aorta of Streptozotocin Diabetic Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33: 351-357.
- Babu, P. V., Sabitha, K. E., Srinivasan, P. and Shyamaladevi, C. S. 2007. Green Tea Attenuates Diabetes Induced Maillard type Fluorescence and Collagen Cross-linking in The Heart of Streptozotocin Diabetic Rats. *Pharmacological Research*, 5: 433-440.
- Ballinger, CA., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, LJ. 1999. Identification of CHIP, A Novel Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein That Interacts with Heat Shock Proteins and Negatively Regulates Chaperone Functions. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 4535-4545
- Barngrover, D. A. and Dills, W. L., Jr. 1983. The Involvement of Liver Fructokinase in The Metabolism of D-Xylulose and Xylitol in Isolated Rat Hepatocytes. *Journal of Nutrition*, 113: 522-530.
- Basta, G. 2008. Receptor for Advanced Glycation end Products and Atherosclerosis: From Basic Mechanisms to Clinical Implications. *Atherosclerosis*, 196: 9-21.
- Biswas, A., Wang, B., Miyagi, M., Nagaraj, RH. 2008. Effect of Methylglyoxal Modification on Stress-Induced Aggregation of Client Proteins and Their Chaperoning by Human AlphaA-Crystallin. *Biochemical Journal*, 409: 771-777.

- Boaz, L., Moshe J. Werman. 2001. Fructose Triggers DNA Modification and Damage in A *Escherichia coli* Plazmid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 235-241.
- Bousova, I., Vukasovic, D., Juretic, D., Palicka, V. and Drsata, J. 2005. Enzyme Activity and AGE Formation in a Model of AST Glycoxidation by D-fructose *In Vitro*. **Acta Pharmaceutica**, 55: 107-114.
- Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. 1972. The Cellular Production of Hydrogen Peroxide. **Biochemical Journal**, 128(3): 617-630.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., and Popkin, B. M. 2004. Consumption of High-Fructose Cor Syrup in Beverages May Play A Role in The Epidemic of Obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 79 (4): 537-543.
- Breen, A. P., and Murphy, J. A. 1995. Reactions of Oxyl Radicals with DNA. **Free Radical and Biology Medicine**, 18(6): 1033-1077.
- Browning, J. D., and Horton, J. D. 2004. Molecular Mediators of Hepatic Steatosis and Liver Injury. **Journal of Clinical Investigation**, 114 (2): 147-152.
- Brownlee, M. 2000. Negative Consequences of Glycation. **Metabolism**, 49: 9-13.
- Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., Cerami, A. 1986. Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. **Science**, 232: 1629-1632.
- Brozmanova, J., Dudas, A., and Henriques, J. A. 2001. Repair of Oxidative DNA Damage-An Important Factor Reducing Cancer Risk. **Neoplasma**, 48: 85-93.
- Bucala, R., Model, P., Cerami, A. 1984. Modification of DNA by Reducing Sugars: A Possible Mechanism for Nucleic Acid and Age-Related Dysfunction in Gene Expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states**, 81(1): 105–109.
- Bucala, R., Model, P., Russel, M., Cerami, A. 1985. Modification of DNA by Glucose 6-Phosphate Induces DNA Rearrangements in An *Escherichia Coli* Plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states**, 82: 8439 –8442.
- Bunn, H. F. & Higgins, P. J. 1981. Reaction of Monosaccharides with Proteins: Possible Evolutionary Significance. **Science**, 213: 222-224.
- Casas, S., Gomis, R., Gribble, FM., Altirriba, J., Knuutila, S. 2007. Impairment of The Ubiquitin-Proteasome Pathway is A Downstream Endoplasmic Reticulum Stress Response Induced by Extracellular Human İslet Amyloid Polypeptide and Contributes to Pancreatic Beta-Cell Apoptosis. **Diabetes**, 56: 2284-2294.
- Cerami, C., Founds, H., Nicholl, I., Mitsuhashi, T., Giordano, D., Vanpatten, S., Lee, A., Al-Abed, Y., Vlassara, H., Bucala, R. and Cerami, A. 1997. Tobacco Smoke is A Source of Toxic Reactive Glycation Products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94: 13915-13920.

- Chance, B., Oshino, N., Sugano, T., and Mayevsky, A. 1973. Basic Principles of Tissue Oxygen Determination From Mitochondrial Signals. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 37A: 277-292
- Chatham, J. C, Gilbert, H. F., and Radda, G. K. 1989. The Metabolic Consequences of Chayaratanasin ,P., Alejandro Barbieri,M., Suanpairintr, N. and Adisakwattana, S. 2015. İnhibitory Effect of *Clitoria ternatea* Flower Petal Extract on Fructose İnduced Protein Glycation and Oxidation Dependent Damages to Albümin *İn Vitro* Aminoguanidine. *Complementary and Alternative Medicine*, 15: 27.
- Chellan, P. & Nagaraj, R. H. 1999. Protein Crosslinking by the Maillard Reaction: Dicarbonyl-Derived İmidazolium Crosslinks in Aging and Diabetes. *Archives of Biochemistry Dysfunction and Biophysics*, 268: 98-104.
- Cheng, K.-W., Wong, C. C., Chao, J.; Lo, C., Chen, F., Chu, I. K., Che, C.-M., Ho, C.-T., Wang, M. 2009. İnhibition of Mutagenic PhIP Formation by Epigallocatechin Gallate via Scavenging of Phenylacetaldehyde. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: 716-725.
- Chesne, S., Rondeau, P., Armenta, S., Bourdon, E. 2006. Effects of Oxidative Modifications İnduced by The Glycation of Bovine Serum Albumin on İts Structure and on Cultured Adipose Cells. *Biochimie*, 88: 1467-77.
- Czech, M. P. 1995. Molecular Actions of İnsulin on Glucose Transport. *Annual Review of Nutrition*, 15: 441-471.
- Danpure, C. J., and Rumsby, G. 2004. Molecular Aetiology of Primary Hyperoxaluria and İts İmplications for Clinical Management. *Expert Review Molecular Medicine*, 6: 1-16.
- De Groot H., Rauen U. 1998. Tissue İnjury by Reactive Oxygen Species and the Protective Effect of Flavanoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12: 249-55.
- Dills, L. 1993. Protein Fructosylation: Fructose and the Maillard Reaction. *American Journal of Clinical Nutrition*, 58: 779-787.
- Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R. and Baynes, J. W. 1993. Accumulation of Maillard Reaction Products in Skin Collagen in Diabetes and Aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 91: 2463-2469.
- Edelstein, D., Brownlee, M. 1992. Mechanistic Studies of Advanced Glycosylation end Product İnhibition by Aminoguanidine. *Diabetes*, 41: 26-29.
- Elosta, A., Ghous, T., Ahmed, N. 2012. Natural Products as Anti-Glycation Agents: Possible Therapeutic Potential for Diabetic Complications. *Current Diabetes Review*, 8: 92-108.
- Evans, TW. 2002. Albumin as A Drug-Biological Effects of Albumin Unrelated to Oncotic Pressure. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16: 6-11.
- Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J.M., Periasami, R., Seongsu, and Tappy, L. 2005. Effect of Fructose Overfeeding and Fish Oil Administration on Hepatic *De Novo* Lipogenesis and İnsulin Sensitivity in Healthy Men. *Diabetes*, 54: 1907-1913.

- Faist, V. and Erbersdobler, H. 2001. Metabolic Transit and *In Vivo* Effects of Melanoidins and Precursor Compounds Deriving From the Maillard Reaction. ***Annals of Nutrition and Metabolism***, 45: 1-12.
- Farnsworth, N. R., Akerev, O., Bingel, A.S. 1985. Medicinal Plants in Therapy . ***Bull World Health Organ***, 63: 9865-9871
- Ferrari, C.K., Torres, E.A., 2003. Biochemical Pharmacology of Functional Foods and Prevention of Chronic Diseases of Aging. ***Biomed Pharmacother***, 57:251–260.
- Ferreira, A. E., Ponces Freire, A. M. and Voit, E. O. 2003. A Quantitative Model of the Generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard Reaction Between Collagen and Glucose. ***The Biochemical journal***, 376: 109-121.
- Frischmann, M., Bidmon, C., Angerer, J., Pischetsrieder, M. 2005. Identification of DNA Adducts of Methylglyoxal. ***Chemical Research in Toxicol***, 18: 1586 –1592.
- Frydman, J., 2001. Folding of Newly Translated Proteins *In Vivo*: The Role of Molecular Chaperones. ***Annual Review of Biochemistry***, 70: 603–647.
- Fu, M. X., Wells-Knecht, K. J., Blackledge, J. A., Lyons, T. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. 1994. Glycation, Glycooxidation, and Cross-Linking of Collagen by Glucose. ***Diabetes***, 43: 676–683.
- Gaby, AR. 2005.Advers Effects of Dietary Fructose. ***Alternative Medicine Review***, 10: 294-306.
- Gemayel, R., Fortpied, J., Rzem, R., Vertommen, D., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E. 2007. Many Fructosamine 3-Kinase Homologues in Bacteria are Ribulosamine/Erythrulosamine 3-kinases Potentially Involved in Protein Deglycation. ***The FEBS Journal***, 274: 4360-74.
- Gerhardinger, C., Marion, M. S., Rovner, A., Glomb, M. and Monnier, V. M. 1995. Novel Degradation Pathway of Glycated Amino Acids Into Free Fructosamine by A Pseudomonas sp. Soil Strain Extract. ***The Journal of biological chemistry***, 270: 218-224.
- Giacco, F. and Brownlee, M. 2010. Oxidative Stress and Diabetic Complications. ***Circulation Research***, 107: 1058-1070.
- Goldberg, AL. 2003. Protein Degradation and Protection Against Misfolded or Damaged Proteins. ***Nature***, 426: 895–899.
- Goldberg, T., Cai, W., Peppia, M., Dardaine, V., Baliga, B. S., Uribarri, J. and Vlassara, H. 2004. Advanced Glycooxidation end Products in Commonly Consumed Foods. ***Journal of the American Dietetic Association***, 104: 1287-1291.
- Gomes, R. A., Sousa Silva, M., Vicente Miranda, H., Ferreira, A. E., Cordeiro, C. A. and Freire, A. P. 2005. Protein Glycation in Saccharomyces Cerevisiae. Argpyrimidine Formation and Methylglyoxal Catabolism. ***Federation of American Societies for Experimental Biology Journal***, 272: 4521-4531.

Ha, H.L., Shin, H.J., Feitelson, M.A., and Yu, D.Y. 2010. Oxidative Stress and Antioxidants in Hepatic Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 16 (48): 6035-6043.

Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46: 531-542.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 2007. *Free Radicals In Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press, UK.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. 1992. Biologically Relevant Metal Ion-Dependent Hydroxyl Radical Generation. An Update. *FEBS Lett*, 307(1):108-112.

Hartl, FU., Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular Chaperones In The Cytosol: From Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, 295: 1852–1858.

Havel, P. J. 2005. Dietary Fructose: Implications for Dysregulation of Energy Homeostasis and Lipid/Carbohydrate Metabolism. *Nutrition Review*, 63(5): 133-157.

Hipkiss, A. R. 2005. Glycation, Ageing and Carnosine: Are Carnivorous Diets Beneficial? *Mechanisms of Ageing and Development*, 10: 1034-1039.

Hipkiss, A. R., Michaelis, J. and Syrris, P. 1995. Non-Enzymatic Glycosylation of The Dipeptide L-Carnosine, A Potential Anti-Protein-Cross-linking Agent. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 371: 81-85.

Hirasawa, Y., Matsui, Y., Ohtsu, S., Yamane, K., Toyoshi, T., Kyuki, K., Sakai, T., Feng, Y., Nagamatsu, T. 2008. Involvement of Hyperglycemia in Deposition of Aggregated Protein in Glomeruli of Diabetic Mice. *European Journal of Pharmacology*, 601: 129-135.

Hobart, L. J., Seibel, I., Yeargans, G. S. and Seidler, N. W. 2004. Anti-crosslinking properties of cornosine: Significance of histidine. *Life Science*, 11, 1379-1389.

Hudson, B. and Schmidt, A. 2004. RAGE: A Novel Target for Frug Intervention in Diabetic Vascular Disease. *Pharmaceutical Research*, 21: 1079-1086.

Huggins, T. G., Wells-Knecht, M. C., Detorie, N. A., Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. 1993. Formation of O-Tyrosine and Dityrosine in Proteins During Radiolytic and Metal-Catalyzed Oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 12341-12347.

Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R. and Rauvala, H. 2000. Coregulation of Neurite Outgrowth and Cell Survival by Amphoterin and S100 Proteins Through Receptor for Advanced Glycation end Products (RAGE) Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 40096-40105.

Hydroperoxide Perfusion on The Isolated Rat Heart. *European Journal of Biochemistry*, 184: 657-662.

Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H. 1996. N (epsilon)-(carboxymethyl)Lysine Protein Adduct is A Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation end Products of The Maillard Reaction. *Biochemistry*, 35: 8075-8083.

Jaeger, H., Janositz, A. and Knorr, D. 2010. The Maillard Reaction and Its Control During Food Processing. The Potential of Emerging Technologies. *Pathologie Biologie*, 58: 207-213.

Jariyapamornkoon, N., Yibchok-anun, S., Adisakwattana, S. 2013. Inhibition of Advanced Glycation end Products by Red Grape Skin Extract and Its Antioxidant Activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 171.

Je, J.Y., Kim, S.K.. 2006. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Aminoderivatized Chitosan with Different Degree of Deacetylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14:5989–5994.

Jing, H., Kitts, D.D. 2004. Antioxidant Activity of Sugar–Lysine Maillard Reaction Products in Cell Free and Cell Culture Systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 429: 154-163.

Kang, J. H. 2003. Oxidative Damage of DNA by The Reaction of Amino Acid with Methylglyoxal in The Presence of Fe(III). *International Journal of Biological Macromolecules*, 33: 43-48.

Kang, J.H. 2005. Protective Effect of Carnosine and Relative Compounds on DNA Cleavage by Advanced Glycation end Products. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 26: 178-180.

Katiyar S.K. 2005. Silmarin and Skin Cancer Prevention: Anti-Inflammatory, Antioxidant and Immunomodulatory Effects. *International Journal of Oncology*, 26(1): 169-76.

Khalifah, R. G., Baynes, J. W., Hudson, B. G. 1999. Amadorins: Novel Post-Amadori Inhibitors of Advanced Glycation Reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257: 251-258.

Kiho, T., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K. & Inakuma, T. 2004. Tomato Paste Fraction Inhibiting the Formation of Advanced Glycation end-Products. *Bioscience, Biotechnolog and Biochemistry journal*, 68: 200-205.

Knerr, T., Severin, T. 1993. Reaction of Glucose with Guanosine. *Tetrahedron Lett*, 34: 7389-7390.

Koschinsky, T., He, C.-J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K. and Vlassara, H. 1997. Orally Absorbed Reactive Glycation Products (Glycotoxins): An Environmental Risk Factor in Diabetic Nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 6474-6479.

Kousar, S., Sheikh, M. A. and Asghar, M. 2012. Antiglycation Activity of Thiamin-HCl and Benfotiamine in Diabetic Condition. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 62: 1033-1038.

Koyama, H., Yamamoto, H. and Nishizawa, Y. 2007. RAGE and Soluble RAGE: Potential Therapeutic Targets for Cardiovascular Diseases. *Molecular Medicine*, 13: 625-635.

Lapolla, A., Molin, L. and Traldi, P. 2013. Protein Glycation in Diabetes as Determined by Mass Spectrometry. *International Journal of Endocrinology*, 2013: 11.

- Lauterburg, B. H., Corcoran, G. B., Mitchell, J. R. 1983. Mechanism of Action of Nacetylcycteine in The Protection Against The Hepatotoxicity of Acetaminophen in Rats. *In Vivo. The Journal of Clinical Investigation*, 71: 980-991.
- Lee, A., Cerami, A. 1987. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. *Mutation Research*, 179: 151–158.
- Lee, K.A., and Tappy, L. 2006. Metabolic Effects of Fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care*, 9: 469-475.
- Lee, O., Bruce, W. R., Dong, Q., Bruce, J., Mehta, R., O'Brien, P. J. 2009. Fructose and Carbonyl Metabolites as Endogenous Toxins. *Chemico-Biological Interaction*, 178: 332-339.
- Leonil, J., Molle, D., Fauquant, J., Maubois, J., Pearce, R. and Bouhallab, S. 1997. Characterization by Ionization Mass Spectrometry of Lactosyl-b-Lactoglobulin Conjugates Formed During Heat Treatment of Milk and Whey Identification of One Lactose Binding Site. *Journal of Dairy Science*, 80: 2270-2281.
- Levi, B.1., Werman, M.J. 2001. Fructose triggers DNA Modification and Damage in an Escherichia Coli Plasmid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(4):235-241.
- Lou, H., Yuan, H., Yamazaki, Y., Sasaki T. ve Oka, S. 2001. Gamma Radiation Effects on Peanut Skin Antioxidants. *Planta Medicine*, 67: 345-349.
- Luevano-Contreras, C. and Chapman-Novakofski, K. 2010. Dietary Advanced Glycation end Products and Aging. *Nutrients*, 2: 1247-1265.
- Madani, H., Talebolhosseini, M., Asgary, S., and Naderi G.H. 2008. Hepatoprotective Activity of Siybum Marianum and Cichotrium İntybus Against Thioacetamide in Rat. *Pakistan journal of Nutrition*, 7(1): 172-176.
- Marchetti, P. 2009. Advanced Glycation end Products (AGEs) and Their Receptors (RAGEs) in Diabetic Vascular Disease. *Medicographia*, 31: 257-266.
- Masood, A.Khan., Shehwaz, Anwar., Ahmad, N., Aljarbou, Mohammad Al-Orainy., Yosef H. Aldebasi, Sehbanul, İslam., Hin,a Younus. 2014. Protective Effect of Thymoguinone on Glucose or Methylglyoxal-Induced Glycation of Superoxide Dismutase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6-20.
- Matsuda, H., Whang, T., H Managi, H. and Yoshikawi, M. 2003. Structural Requirements of Flavonoids for İnhibition of Protein Glycation and Radical Scavenging Activities. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 11: 5317-5323.
- Matsumoto, K., Nagai, R., Masunaga, K., Yoshida, M., Ueda, S., Smedsrød, B. and Horiuchi, S. 2002. Endocytic Uptake of Advanced Glycation end Products by Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells is Mediated by A Receptor Distinct from The Class A Scavenger Receptor. *International Congress Series*, 1245: 157-162.
- Mayes, P. A. 1993. Intermediary Metabolism of Fructose. The *American Journal of Clinical Nutrition*, 58: 754S-765S.

- McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Bailie, K. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. and Lyons, T. J. 1993. Maillard Reaction Products and Their Relation to Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 91: 2470-2480.
- Merforth, S., Kuehn, L., Osmers, A., Dahlmann, B. 2003. Alteration of 20S Proteasome-Subtypes and Proteasome Activator PA28 in Skeletal Muscle of Rat After Induction of Diabetes Mellitus. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 35: 740-748.
- Mesias, M., Navarro, M., Martinez-Saez, N., Ullate, M., Del Castillo, M.D., Morales, F.J. 2014. Antiglycative and Carbonyl Trapping Properties of the Water Soluble Fraction of Coffee Silverskin. *Food Research International*, 62:1120-1126.
- Miller, A., Adeli, K. 2008. Dietary Fructose and The Metabolic Syndrome. *Current Opinion Gastroenterology*, 24: 204-209.
- Mitsuhashi, T., Vlassara, H., Founds, H.W., Li, Y.M. 1997. Standardising The Immunological Measurement of Advanced Glycation end Products Using Normal Human Serum. *Journal Immunological Methods*, 207: 79-88.
- Miyata, T., van Ypersele de Strihou, C. 2003. Angiotensin II Receptor Blockers and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors: Implication of Radical Scavenging and Transition Metal Chelation in Inhibition of Advanced Glycation end Product Formation. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 419: 50-54.
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. 1991. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacology Review*, 43: 109-142.
- Monnier, V. M. 2003. Intervention Against the Maillard Reaction *In Vivo*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419: 1-15.
- Monnier, V.M. 2005. Bacterial Enzymes That can Deglycate Glucose- and Fructose-Modified Lysine. *Biochemical Journal*, 392: e1-3.
- Monnier, V.M., Nagaraj, R.H., Portero-Otin, M., Glomb, M., Elgawish, A.H. 1996. Structure of Advanced Maillard Reaction Products and Their Pathological Role. *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl 5): 20-26.
- Morgan, M., and Liu, Z.G. 2011. Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF- κ B Signaling. *Cell Research*, 21: 103-115.
- Morimitsu, Y., Yoshida, K., Esaki, S. and Hirota, A. 1995. Protein Glycation Inhibitors From Thyme (*Thymus vulgaris*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59: 2015-2021.
- Morita, J., Kashimura, N. 1991. The Maillard Reaction of DNA with Dfructose 6-Phosphate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 1359-1366.
- Munch, G., Keis, R., Wessels A. 1997. Determination of Advanced Glycation end Products in Serum by Fluorescence Spectroscopy and Competitive ELISA. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 35: 669-677.

- Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K.. 2003. CHIP: A Quality-Control E3 Ligase Collaborating with Molecular Chaperones. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 572– 578.
- Nagasawa, T., Tabata, N., Ito, Y., Aiba, Y., Nishizawa, N., Kitts, DD. 2003. Dietary G-rutin Suppresses Glycation in Tissue Proteins of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 252: 141-147.
- Nangaku, M., Miyata, T., Sada, T., Mizuno, M., Inagi, R., Ueda, Y., Ishikawa, N., Yuzawa, H., Koike, H., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K.. 2003. Antihypertensive Agents Inhibit *In Vivo* The Formation of Advanced Glycation end Products and Improve Renal Damage in A Type 2 Diabetic Nephropathy Rat Model. *Journal American Society Nephrology*, 14: 1212-1222.
- Nessar, A. 2005. Advanced Glycation End Products-role in Pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67: 3-21.
- Nielsen, S. J. and Popkin, B. M. 2004. Changes in Beverage Intake Between 1977 and 2001. *American Journal of Preventive Medicine*, 27: 205-210.
- Nilsson, B. O. 1999. Biological Effects of Aminoguanidine: An Update. *Inflammation Research*, 48: 509- 515.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., and Brownlee, M. 2000. Normalizing Mitochondrial Superoxide Production Blocks Three Pathways of Hyperglycaemic Damage. *Nature*, 404: 787-790.
- Niwa, T. 1999. 3-Deoxyglucosone: Metabolism, Analysis, Biological Activity, and Clinical Implication. *Journal of Chromatography Biomedical Sciences*, 731: 23-36.
- Nursten, HE. 2005. The Maillard Reaction. Chemistry, biochemistry, and implications. *Royal Society of Chemistry*. Page: 36. Cambridge.
- O'Brien, J. and Morrissey, P. 1990. Nutritional and Toxicological Aspects of the Maillard Browning Reaction in Foods. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*, 28: 211-248.
- Ochs, S., Severin, T. 1994. Reaction of 2'-Deoxyguanosine with Glyceraldehyde. *Annual Review of Physical Chemistry*, 851–853.
- Ortwerth, B. J., James, H., Simpson, G. and Linetsky, M. 1998. The Generation of Superoxide Anions in Glycation Reactions with Sugars, Osones, and 3-Deoxyosones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245: 161-165.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., and Abdelmalek, M. F. 2008. Fructose Consumption As A Risk Factor for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Hepatology*, 48(6): 993-999.
- Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1): 315-424.

Pal, S., Saha, C. 2014. A Review on Structure-Affinity Relationship of Dietary Flavonoids with Serum Albumins. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 32: 1132–1147.

Papanastasiou, P., Grass, L., Rodela, H., Patrikarea, A., Oneopoulos, D., Diamandis, EP. 1994. Immunological Quantification of AGE's in Serum of Patients on Haemodialysis or Peritoneal Dialysis. **Kidney International**, 46: 216-222.

Paul, R. G., Avery, N. C., Slatter, D. A., Sims, T. J. and Bailey, A. J. 1998. Isolation and Characterization of Advanced Glycation end Products Derived from the *In Vitro* Reaction of Ribose and Collagen. **The Biochemical journal**, 330: 1241-1248.

Peppia, M., Uribarri, J. and Vlassara, H. 2000. Glucose, Advanced Glycation end Products, and Diabetes Complications: What is New and What Works. **Clinical Diabetes**, 21: 186-187.

Pischetsrieder, M., Seidel, W., Munch, G., Schinzel, R. 1999. Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 264: 544–549.

Popova, E., Mironov, R. and Odjakova, M. 2010. Non-Enzymatic Glycosylation and Deglycating Enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 24: 1928-1935.

Portero-Otin, M., Pamplona, R., Ruiz, MC., Cabisco, E., Prat, J. 1999. Diabetes Induces An Impairment in The Proteolytic Activity Against Oxidized Proteins and A Heterogeneous Effect in Nonenzymatic Protein Modifications in The Cytosol of Rat Liver and Kidney. **Diabetes**, 48: 2215–2220.

Pradhan S.C and Girish C. 2006. Hepatoprotective Herbal Drug, Silmarin Experimental Pharmacology to Clinical Medicine Indian. **The Journal of Medical Research**, 124: 491-504.

Rahbar, S. and Figarola, J. 2003. Novel Inhibitors of Advanced Glycation end Products. **Advances of Biochemistry and Biophysics**, 419: 63-79.

Rayssiguier, Y., Gueux, E., Nowacki, W., Rock, E., Mazur, A. 2006. High Fructose Consumption Combined with Low Dietary Magnesium Intake May Increase The Incidence of The Metabolic Syndrome by Inducing Inflammation. **Magnesium Research**, 19: 237-243.

Richard, D. S., Emily, J. N. and Luigi, F. 2010. Does Accumulation of Advanced Glycation end Products Contribute to the Aging Phenotype? **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, 65A: 963-975.

Roche, M., Rondeau, P., Singh, NR., Tarnus, E., Bourdon, E. 2008. The Antioxidant Properties of Serum Albumin. **FEBS Lett**, 582: 1783-7.

Roglans, N., Vila, L., Farre, M. 2007. Impairment of Hepatic Stat-3 Activation and Reduction of PPAR α Activity in Fructose-Fed Rats. **Hepatology**, 35: 778-788.

Rondeau, P., Bourdon, E. 2011. The Glycation of Albumin; Structural and Functional Impacts. **Biochimie**, 93: 645-658.

Rosca, M. G., Mustata, T. G., Kinter, M. T., Ozdemir, A. M., Kern, T. S., Szweda, L. I., Brownlee, M., Monnier, V. M., and Weiss, M. F. 2005. Glycation of Mitochondrial Proteins

from Diabetic Rat Kidney is Associated with Excess Superoxide Formation. *American Journal Physiology Renal Physiology*, 289(2): F420-F430.

Rutledge, A.C., and Adeli, K. 2007. Fructose and The Metabolic Syndrom: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. *Nutrition Reviews*, 65: S13-S23.

Saad, M. F., Khan, A., Sharma, A., Michael, R., Riad-Gabriel, M. G., Boyadjian, R., Jinagouda, S. D., Steil, G. M., and Kamdar, V. 1998. Physiological Insulinemia Acutely Modulates Plasma Leptin. *Diabetes*, 47(4): 544-549.

Sakurako, N., Hongyan, Li., Adijiang, A., Pischetsrieder, M. and Niwa T. 2007. Pyridoxal Phosphate Prevents Progression of Diabetic Nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 22: 2165-2174.

Sang, S., Shao, X., Bai, N., Lo, CY., Yang, CS., Ho, CT. 2007. Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate: A New Trapping Agent of Reactive Dicarbonyl Species. *Chemical Research in Toxicology*, 20: 1862-1870.

Satish Kumar, M., Mrudula, T., Mitra, N., Bhanuprakash Reddy, G. 2004. Enhanced Degradation and Decreased Stability of Eye Lens Alpha-Crystallin Upon Methylglyoxal Modification. *Experimental Eye Research*, 79: 577-583.

Schalkwijk, CG., van Bezu, J., van der Schors, RC., Uchida, K., Stehouwer, CD. 2006. Heat-Shock Protein 27 is A Major Methylglyoxal-Modified Protein in Endothelial Cells. *FEBS Lett*, 580: 1565–1570.

Schuler, W. 1952. The İnhibition of Histaminase. *Experientia*, 8: 230-232.

Seidel, W., Pischetsrieder, M. 1998. Biochemistry and Pathophysiology of Glycation of DNA: Implications in Diabetes. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-legrand)*, 44: 1165–1170.

Seidel, W., Pischetsrieder, M. 1998. Immunochemical Detection of N²-[1-(1-Carboxy)ethyl]Guanosine, An Advanced Glycation End Product Formed by The Reaction of DNA and Reducing Sugars or L-Ascorbic Acid *In Vitro*. *Biochimia et Biophysicas Acta*, 1425: 478-484.

Seidel, W., Pischetsrieder, M. 1998. Reaction of Folic Acid with Reducing Sugars and Sugar Degradation Products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett*, 8: 2017–2022.

Sell, D., Nagaraj, R., Sunitha, K., Grandhee, S., Odetti, P., Lapolla, A., Fogarty, J. and Monnier, V. 1999. Pentosidine: A molecular Marker for the Cumulative Damage to Proteins in Diabetes, Aging, and Uremia. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 7: 239-251.

Shield, J., Poyser, K., Hunt, L., Pennock, C. 1994. Fructosamine and Glycated Haemoglobin in The Assessment of Long Term Glycaemic Control in Diabetes. *Archieves and Disease in Childhood*, 71: 443-445.

Shiwani, S., Kumar, N.S, Wang, M.H. 2012. Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutrition Research and Practice*, 6(5): 389–395.

Spiro, R. G. 2002. Protein Glycosylation: Nature, Distribution, Enzymatic Formation, and Disease Implications of Glycopeptide Bonds. *Glycobiology*, 12: 43R-56R.

Srikanth, V., Maczurek, A., Phan, T., Steele, M., Westcott, B., Juskiw, D. and Münch, G. 2011. Advanced Glycation end Products and Their Receptor RAGE in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 32: 763-777.

Steinbeck, M. J., Khan, A. U., and Karnovsky, M. J. 1993. Extracellular Production of Singlet Oxygen by Stimulated Macrophages Quantified Using 9,10-Diphenylanthracene and Perylene in A Polystyrene Film. The *Journal of Biological Chemistry*, 268: 15649-15654.

Stitt, A.; Gardiner, T. A.; Alderson, N. L.; Canning, P.; Frizzell, N.; Duffy, N.; Boyle, C.; Januszewski, A. S.; Chachich, M.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. 2002. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes*, 51:2826-2832.

Szwergold, B. S., Howell, S. and Beisswenger, P. J. 2001. Human Fructosamine-3-kinase: Purification, Sequencing, Substrate Specificity, and Evidence of Activity *In Vivo*. *Diabetes*, 50: 2139-2147.

Tahera H., Ramza A.K., Eslam M., and Mohammad R.S.A. 2005. Analysis of Silybum marianum (L.) Gaert from Iran Pakistan. *Journal of Biological Sciences*, 8(12): 1778-1782.

Tappel, M. E., Chaudiere, J., and Tappel, A. L. 1982. Glutathione Peroxidase Activities of Animal Tissues. *Comperative Biochemistry and Physiology*, 73(4): 945-949.

Tappy, L., Le, K.A., Tran, C., and Paquot, N. 2010. Fructose and Metabolic Diseases: New Findings, New Questions. *Nutrition*, 26: 1044-1049.

Thornalley, P. 1998. Glutathione-Dependent Detoxification of α -Oxoaldehydes by The Glyoxalase System: Involvement in Disease Mechanisms and Antiproliferative Activity of Glyoxalase I inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 137-151.

Thornalley, P. 2003. Use of Aminoguanidine (Pimagedine) to Prevent The Formation of Advanced Glycation end Products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419: 31-40.

Thornalley, P., Langborg, A. and Minhas, H. 1999. Formation of Glyoxal, Methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone in The Glycation of Proteins by Glucose. *Biochemical Journal*, 344: 109-116.

Thorpe, S. R. and Baynes, J. W. 2003. Maillard Reaction Products in Tissue Proteins: New Products and New Perspectives. *Amino Acids*, 25: 275-281.

Turgut, F., Bolton, WK. 2010. Potential New Therapeutic Agents for Diabetic Kidney Disease. *American Journal of Kidney Disease*, 55: 928-940.

Turrens, J. F. 1997. Superoxide Production by The Mitochondrial Respiratory Chain. *Bioscience Report*, 17 (1): 3-8.

Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., Yong, A., Striker, G. E. and Vlassara, H. 2010. Advanced Glycation end Products in Foods and A Practical Guide to Their Reduction in The Diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110: 911-916.

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. 2006. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. ***Chemico-Biological Interaction***, 160 (1): 1-40.
- Vasdev, S., Ford, C. A., Longerich, L., Parai, S., Gadag, V., Wadhawan, S. 1998. Aldehyde Induced Hypertension in Rats: Prevention by N-Acetyl Cysteine. ***Artery***, 23(1):10-36.
- Vasdev, S., Ford, C.A., Longerich, L., Gadag, V., Wadhawan, S. 1998. Role of Aldehydes in Fructose Induced Hypertension. ***Molecular and Cellular Biochemistry***, 181: 1-9.
- Venkatraman, J., Aggarwal, K. and Balaram, P. 2001. Helical Peptide Models for Protein Glycation: Proximity Effects in Catalysis of the Amadori Rearrangement. ***Chemistry and Biology***, 8: 611-625.
- Verzelloni, E., Pellacani, C., Tagliazucchi, D., Tagliaferri, S., Calani, L., Costa, L.G., Brighenti, F., Borges, G., Crozier, A., Conte, A., Del Rio, D. 2011. Antiglycative and Neuroprotective Activity of Colon-Derived Polyphenol Catabolites. ***Molecular Nutrition and Food Research***, 55: 1-9.
- Vlassara, H., Brownlee, M. & Cerami, A. 1988. Specific Macrophage Receptor Activity for Advanced Glycosylation end Products Inversely Correlates with Insulin Levels *In Vivo*. ***Diabetes***, 37: 456-461.
- Vos, M.B., Kimmons, J.E., Gillespie, C., Welsh, J., and Blanck H.M. 2008. Dietary Fructose Consumption Among US Children and Adults: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. ***The Medscape Journal of Medicine***, 10: 160.
- Waris, S., Pischetsrieder, M., Saleemuddin, M. 2010. DNA Damage By ribose: Inhibition at high Ribose Concentrations. ***Indian Journal of Biochemistry & Biophysics***, 47:148-156.
- Wautier, J. L. & Schmidt, A. M. 2004. Protein Glycation: a Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction. ***Circulation Research***, 95: 233-238.
- Wautier, J., Guillausseau, P. 2001. Advanced Glycation end Products, Their Receptors and Diabetic Angiopathy. ***Diabetes Metabolism***, 27: 535-42.
- Wautier, M.P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M., and Wautier, J.L. 2001. Activation of NADPH Oxidase by AGE Links Oxidant Stress to Altered Gene Expression Via RAGE. ***American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism***, 280: E685-E694.
- Wen, Y., Skidmore, J.C., Porter-Turner, M.M., Rea, C.A., Khokhe, MA., Singh, B.M. 2002. Relationship of Glycation, Antioxidant Status and Oxidative Stress to Vascular Endothelial Damage in Diabetes. ***Diabetes, Obesity and Metabolism Journal***, 4: 305-308.
- Wiame, E., Lamosa, P., Santos, H., Van Schaftingen, E. 2005. Identification of Glucoselysine-6-Phosphate Deglycase, An Enzyme Involved in The Metabolism of The Fructation Product Glucoselysine. ***Biochemical Journal***, 392: 263-269.
- Win, M. T., Yamamoto, Y., Munesue, S., Saito, H., Han, D., Motoyoshi, S., Kamal, T., Ohara, T., Watanabe, T. & Yamamoto, H. 2012. Regulation of RAGE for Attenuating Progression of Diabetic Vascular Complications. ***Experimental Diabetes Research***, 2012: 1-8.

- Wolff, S. P. and Dean, R. T. 1987. Glucose Autoxidation and Protein Modification. The Potential Role of 'Autoxidative Glycosylation' in Diabetes. *Biochemical Journal*, 245: 243-50.
- Wood, M. 1986. Plasma Drug Binding: Implications for Anesthesiologists. *Anesthesia and Analgesia*, 65: 786-804.
- Wu, C.H. and Yen, G.C. 2005. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 3167-3173.
- Wu, CH., Huang, SM., Lin, JA., Yen, GC. 2011. Inhibition of Advanced Glycation end Product Formation by Foodstuffs. *Food&Function*, 2: 224-234.
- Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y. & Nakazawa, H. 2000. Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Garcinol from Garcinia Indica Fruit Rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 180-185.
- Yan, S.F., Ramasamy, R., and Schmidt, A.M. 2010. The RAGE Axis: A Fundamental Mechanism Signaling Danger to The Vulnerable Vasculature. *Circulation Research*, 106: 842-853.
- Yang, K., Qiang, D., Delaney, S., Mehta, R., Bruce, W.R., and O'Brien, P.J. 2011. Differences in Glyoxal and Methylglyoxal Metabolism Determine Cellular Susceptibility to Protein Carbonylation and Cytotoxicity. *Chemico-Biological Interaction*, 191(1-3): 322-9.
- Yaylayan, V.A., Huyghues-Despointes, A. and Feather, M. S. 1994. Chemistry of Amadori Rearrangement Products: Analysis, Synthesis, Kinetics, Reactions, and Spectroscopic Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34: 321-369.
- Yim, H. S., Kang, S. O., Hah, Y. C., Chock, P. B. and Yim, M. B. 1995. Free Radicals Generated During The Glycation Reaction of Amino Acids by Methylglyoxal. A Model Study of Protein-Cross-Linked Free Radicals. The *Journal of Biological Chemistry*, 270: 28228-28233.
- Yokozawa, T. & Nakagawa, T. 2004. Inhibitory Effects of Luobuma Tea and Its Components Against Glucose-Mediated Protein Damage. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 975-981.
- Zhang, Q., Ames, JM., Smith, RD., John, W., Baynes, JW., Metz, TO. 2009. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research*, 8: 754-69.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Nesrin İNCEÖREN
Doğum Tarihi : 15.08.1988
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri : Lice/DİYARBAKIR
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
21280-Diyarbakır
E-Mail : nesrin.inc@gmail.com

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1994-Haziran 2006

İlkokul ve ortaokul öğrenimimi Adana da Hürriyet İlköğretim okulunda ve Lise eğitimimi Beşocak Anadolu Lisesinde tamamladım.

Eylül 2009-Haziran 2013

Kafkas Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdim.

Şubat 2014-Mevcut Tarih

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “İleri Glikasyon Son Ürünlerinin DNA ve Proteinlerde Meydana Getirdiği Oksidatif Hasara Karşı Deve Diken (Silybum marianum L.) Tohumunun Koruyucu Etkisinin Araştırılması”adlı master tezini Prof. Dr. Göksel KIZIL danışmanlığında bitirdim.



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ADI VE SOYADI	Nesrin İNCEÖREN
ÖĞRENCİ NO	13803031
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017/2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	İleri Glikasyon Son Ürünlerinin DNA ve Proteinlerde Meydana Getirdiği Oksidatif Hasara Karşı Deve Diken (Silybum marianum L.) Tohumunun Koruyucu Etkisinin Araştırılması

İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ

RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	99
BENZERLİK ORANI	% 11
RAPORLAMA TARİHİ	28/05/2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 99 sayfalık kısmına ilişkin, 28/05/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitinadlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 11'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
- ☐ Kaynakça hariç
- ☐ Alıntılar hariç/dâhil
- ☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
Nesrin İNCEÖREN

(İmza)
31/05/2018
Prof. Dr. Göksel KIZIL
Tez Danışmanı

(İmza)
31/05/2018
Prof. Dr. Haluk AYDIN
Anabilim Dalı Başkanı