

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Cyclotrichium niveum BİTKİSİNİN FARKLI
POLARİTEYE SAHİP ÇÖZÜCÜLER İLE
HAZIRLANAN EKSTRAKTLARININ
ANTİOKSİDANT VE DNA'YI SERBEST
RADİKALLERDEN KORUMA ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Sevil EMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(KİMYA ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR
TEMmuz-2006

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Sevil EMEN tarafından yapılan “*Cyclotrichium niveum* Bitkisinin Farklı Polariteye Sahip Çözücüler ile Hazırlanan Ekstraktlarının Antioksidant ve DNA’yı Serbest Radikallerden Koruma Etkilerinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı

Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Göksel KIZIL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 17/07/2006

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

27.07.2006


Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇIOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca her türlü sorunumla büyük bir özveriyle ilgilenen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Göksel KIZIL'a, Arş. Gör. Murat YAVUZ'a ve Arş. Gör. Bircan ÇEKEN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımız için gerekli materyallerin temin edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN'e ve Yrd. Doç. Dr. Zeki KANAY'a teşekkür ederim.

Biyooorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasında yardımcı olan Dicle Üniversitesi Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne (02-FF-10 nolu proje) ve Fen Edebiyat Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu dönemde de beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

AMAÇ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
KISALTMALAR	iv
1. GİRİŞ	1
1. 1. Oksidant ve Antioksidant	1
1. 2. Serbest radikallerin biyolojik kaynakları	3
1. 2. 1. Mitokondrial elektron transport zinciri	3
1. 2. 2. Fagositoz	3
1. 2. 3. Eikosanoitlerin sentezi	5
1. 2. 4. Mikrozomal elektron transport sistem	6
1. 3. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin toksisiteleri	6
1. 3. 1. Lipit peroksidasyonu	9
1. 3. 2. Protein Denatürasyonu	14
1. 3. 3. Nükleik asitlerde oksidatif hasar	14
1. 4. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar	15
1. 4. 1. İnflamasyon hastalıkları	15
1. 4. 2. Ateroskleroz	16
1. 4. 3. Kanser	17
1. 4. 4. Yaşlanma	18
1. 5. Endogenos antioksidant savunma	19
1. 5. 1. Enzimlerle antioksidant koruma	19
1. 5. 2. Serbest radikal söndürücüler ile antioksidant koruma	20
1. 5. 3. Metal iyonlarıyla antioksidant koruma	21
1. 6. Bitkilerde bulunan antioksidantlar	21
1. 6. 1. Bitki sekonder metabolitlerinin kimyası	22
1. 6. 2. Bitkilerin önemli antioksidant bileşenleri	22
1. 6. 2. 1. Fenoller ve fenolik asitler	23
1. 6. 2. 2. Quinonlar	23
1. 6. 2. 3. Flavonler, flavanoidler ve flavonoller	23
1. 6. 2. 4. Tanninler	23

1. 6. 2. 5. Kumarinler	24
1. 6. 2. 6. Terpenoidler	24
1. 6. 2. 7. Alkoloidler	24
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	28
3. MATERYAL VE METOT	30
3. 1. MATERYAL	30
3. 1. 1. Kullanılan Bitki Türü, Tanımı, Yayılışı ve Kullanım Alanları	30
3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3. 1. 3. Kullanılan Aletler	31
3. 2. METOT	31
3. 2. 1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	31
3. 2. 2. Bitki Stoklarının Hazırlanması	33
3. 2. 3. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini	33
3. 2. 4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	34
3. 2. 5. Metal Şelatlama Aktivitesi	35
3. 2. 6. İndirgeme Gücü	36
3. 2. 7. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi	37
3. 2. 8. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi	38
3. 2. 8. 1. Beyin Homojenatının Hazırlanması	39
3. 2. 9. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	39
3. 2. 9. 1. Agaroz Jel'in Hazırlanması	41
3. 2. 9. 2. Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması	41
3. 2. 9. 3. Plazmid DNA Saflaştırma	41
3. 2. 10. İstatiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4. 1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini	43
4. 2. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	43
4. 3. Metal Şelatlama Aktivitesi	43
4. 4. İndirgeme Gücü	44
4. 5. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi	44
4. 6. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi	45

4. 7. DNA AgaroZ Jel Elektroforezi	45
5. TARTIşMA VE SONUÇ	47
6. TABLOLAR, şEKİLLER, RESİMLER	53
7. KAYNAKLAR	75
8. TABLOLARIN LİSTESİ	81
9. şEKİLLERİN LİSTESİ	82
10. RESİMLERİN LİSTESİ	85
11. ÖZGEÇMİş	86

AMAÇ

Serbest radikaller, önemli biyomoleküller üzerinde oksidatif hasara neden olurlar ve kanser, yaşlanma, ateroskleroz, AIDS, kalp hastalıkları, hipertansiyon, Parkinson ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıkların ve daha birçok hastalığın ortaya çıkmasında rol oynarlar. Antioksidantlar, hücrel bileşenlerde, serbest radikal türlerinin neden olduğu oksidatif hasarı önlemede önemli maddelerdir. Canlı organizmaların oksidatif zarara karşı antioksidant savunma mekanizmaları bazı durumlarda yetersiz olabilmektedir. Bu yüzden ek olarak almamız gereken antioksidantların önemi büyüktür. Fenolik maddeler doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bu maddelerin, besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bununla birlikte, sentetik antioksidant olarak bilinen ter-bütıl hidroksianisol (BHA), ter-bütıl hidroksitoluen (BHT)'in insan sağlığında karsinojenik ve toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Sentetik antioksidantların yan etkilerinin olması ve pahalıya mal olması bizleri doğal kaynaklı maddelerden yeni antioksidantlar bulmaya yönlendirmiştir.

Bu çalışmadaki temel amacımız, biyolojik aktiviteleri daha önce çalışılmamış olan, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yetişen ve endemik bir tür olan *Cyclotrichum niveum* bitkisinin tüm kısımlarının (dal+yaprak+çiçek) farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidant, ve DNA'yı serbest radikallerden koruma etkilerini araştırmaktır.

ÖZET

Cyclotrichium niveum, labiate ailesinin bir üyesidir. Türkiye’de baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bitkinin birçok faydasının olduğu öne sürülse de bu konuyla ilgili az sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bu tezde *C.niveum* bitkisinin tüm kısımlarının (dal+yaprak+çiçek) metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının antioksidant aktiviteleri araştırıldı. Toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemiyle belirlendi. Metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının 1 mg’nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı sırasıyla 200.9±35.0, 192.4±42.0, 252.0±42.0 µg gallik asite eşdeğer olarak bulundu.

C.niveum bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının antioksidant aktiviteleri *in vitro* sistemde farklı antioksidant testler kullanılarak araştırıldı. Sıçan beyni homojenatında lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesine bakıldı ve 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikalini, hidroksi radikalini söndürme, indirgeme gücü ve metal şelatlama aktiviteleri incelendi. *C.niveum* metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktları FeCl₂-H₂O₂ sisteminde güçlü lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi ve ayrıca deoksiriboz oksidasyonunda konsantrasyona bağlı olmayan etki gösterdiği tespit edildi. *C.niveum* ekstraktları aynı zamanda DPPH radikal sisteminde dikkat çekici antioksidant aktivite sergilediler. *C.niveum* metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının DPPH radikalini söndürme aktiviteleri 500 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 90.3±1.2, 91.4±0.7, 91.7±0.7 bulundu. Diğer bir antioksidant test olarak metal şelatlama aktivitesi incelendi ve bitki ekstraktlarının Fe²⁺ iyonunu tutma kapasitesinin EDTA’ dan daha düşük olduğu bulundu. *C. niveum* ekstraktlarının aynı zamanda plazmid DNA’yı hidroksi radikallerinin neden olduğu kesimine karşı koruduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, bize *C. niveum* bitkisinin yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Sonraki çalışmalar, metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerinin aydınlatılması ve karakterizasyonuna yönelik olmalıdır. *C. niveum*’un antioksidant aktivitesinde rol alan fenolik bileşenlerin tek olarak mı yoksa sinerjik olarak mı etki gösterdikleri araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Cyclotrichium niveum*, Antioksidant aktivite, DNA hasarı, Serbest radikaller

ABSTRACT

Cyclotrichium niveum, a herb of the labiate family, has been widely used as a flavoring agents in Turkey. Although many benefits have been claimed for this plant, few scientific studies are available in the literature. In this thesis, the antioxidant activity of *C.niveum* aerial parts (stems, leaves and flowers) were determined on methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts. The total phenolic contents of extracts were quantified with the Folin-Ciocalteu reagent and total phenolic content of one-miligram of methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts were equivalent to $200,9 \pm 35.0$, $192,4 \pm 42.0$, $252,0 \pm 42.0$ μg of gallic acid, respectively.

The antioxidant potency of methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts of *C.niveum* were investigate employing various established in vitro systems, such as lipid peroxidation in rat brain homogenate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl radical scavenging, reducing power and iron chelation. Methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts of *C.niveum* aerial parts showed strong inhibitory activity toward lipid peroxidation of rat brain homogenate induced by the $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ system. Furthermore, *C.niveum* extracts exhibited a strong concentration-independent inhibition of deoxyribose oxidation. *C.niveum* extracts also showed a considerable antioxidant activity in the DPPH radical system. The DPPH radical scavenging activity of *C.niveum* methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts were found to be $\% 90,3 \pm 1.2$, 91.4 ± 0.7 , 91.7 ± 0.7 at 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The multiple antioxidant activity of *C.niveum* extracts on ferrous ions were found to be lower than EDTA. Our data also showed that *C.niveum* extracts protect plasmid DNA from cleavage induced by hydroxyl radicals. These results may explain, at least in part, its use as a flavoring agents in Turkey.

Further studies are needed to identify and characterize the bioactive constituents of the methanol, ethyl acetate and n-butanol extracts, as well as the efficiency of individual and synergistic phenolic constituents for the antioxidant activity of *C.niveum* extracts.

Keywords: *Cyclotrichium niveum*, Antioxidant activity, DNA damage, Free radicals

KISALTMALAR

SOD	Süperoksit dismutaz
NAD	Nikotinamit adenin dinükleotit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
ROS	Reaktif oksijen türleri
CAT	Katalaz
Px	Peroksidaz
GSH	Glutasyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
mtDNA	Mitokondrial DNA
Tyr	Tirozin
Trp	Triptofan
Phe	Fenil alanin
His	Histidin
Met	Metiyonin
Cys	Sistein
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
DPPH	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
Supercoiled DNA	Süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I
Open circular DNA	Tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II
Linear DNA	Doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık var, Form III
Cm	<i>Cyclotrichium niveum</i> –metanol ekstraktı
Ce	<i>Cyclotrichium niveum</i> –etilasetat ekstraktı
Cb	<i>Cyclotrichium niveum</i> –n-butanol ekstraktı

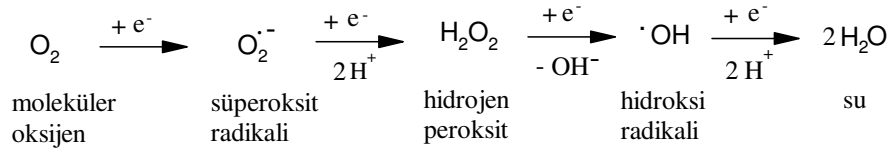
1. GİRİŞ

1. 1. Oksidant ve Antioksidant

Oksijen aerobik yaşam için önemli bir elementtir ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik özellik gösterir.

Serbest radikaller; bir atom veya molekül olabilir, bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içerirler. Birçok serbest radikal son derece reaktif olup kısa ömürlüdür.

Oksijenin ard arda indirgenmesi sonucu oksijen kaynaklı iki serbest radikal, süperoksit ve hidroksi radikali, nispeten daha kararlı ara ürün olan peroksit (H_2O_2) ve zararsız son ürün su oluşur (şekil 1).

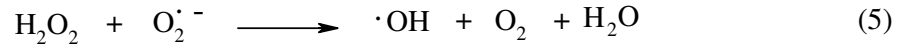
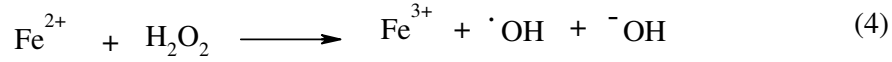
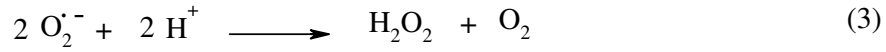
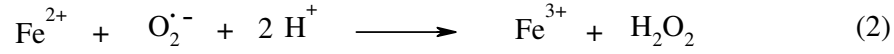
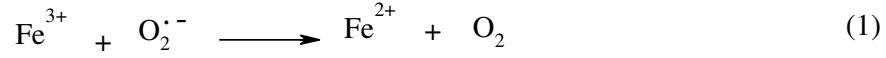


Şekil 1. Moleküler oksijenin indirgenmesi

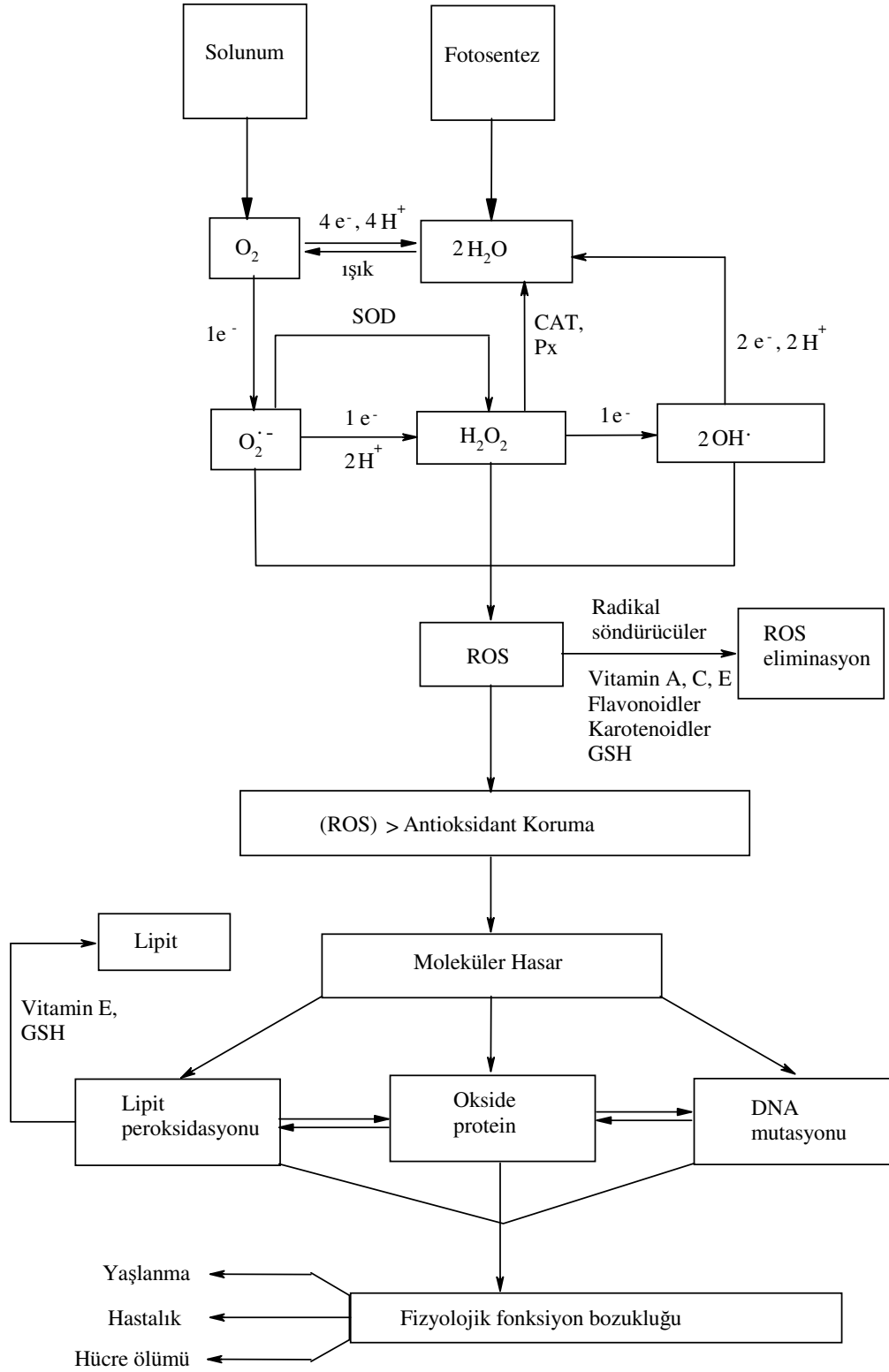
Oksijen kaynaklı olan süperoksit radikali oksijene bir elektron transferi sonucu oluşur. Süperoksit bir indirgen ajan olarak davrandığında oksijene dönüşür (reaksiyon 1). Süperoksit oksitleyici ajan olarak davrandığında hidrojen peroksit oluşur (reaksiyon 2). Süperoksitin self-redoks reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit oluşur (reaksiyon 3). Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına rağmen oksiradikal kimyada ve patolojide önemli bir maddedir. Çünkü kendisi diğer zararlı oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşmasını sağlar. Hidrojen peroksit Fe^{+2} ile reaksiyona girerek OH radikali oluşturur, bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinir (reaksiyon 4).

Hidroksi radikali aynı zamanda demir katalizli Harber-Weiss reaksiyonu sonucu da oluşturulabilir (reaksiyon 5). Harber-Weiss reaksiyonu, Fenton reaksiyonu ile

hidroksi radikali oluşumu (reaksiyon 4) ve süperoksit ile Fe^{3+} 'ün indirgenmesi (reaksiyon 1) reaksiyonlarını içerir.



Harman ve ark., metabolik aktivitenin artmasıyla serbest radikallerin oluşumunun arttığını rapor etmiştir.¹ Yaşlanma ve yaşlanmayla ilgili dejenerativ hastalıkların serbest radikallerin bir etkisi sonucu ortaya çıktığını ve antioksidantların serbest radikallere karşı koruyucu etkide önemli bir rol oynadığını ileri sürmüştür (şekil 1.2). Bu yargı süperoksit dismutazın (SOD) keşfine kadar genel olarak kabul edilmiyordu.² SOD süperoksit anyonun hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Nötrofillerin bakterisidal aktivitesi serbest radikallerin oluşumuyla ilgilidir. Bundan dolayı oksijen kaynaklı serbest radikallerle inflamasyon hastalıkları arasında bir ilişki vardır.³



Şekil 1. 2. Reaktif oksijen türlerinin biyolojik kaynakları ve hücresel hasarları

1. 2. Serbest radikallerin biyolojik kaynakları

1. 2. 1. Mitokondrial elektron transport zinciri

Mitokondride elektron transport zinciri hücre içi süperoksit anyon radikallerinin en önemli kaynaklarından birisidir.⁴ Mitokondrinin en önemli görevi enerji üretimi ve korumasıdır. NADH ve FADH₂ 'nin oksidasyonu, mitokondrinin iç zarında meydana gelen elektron transfer tepkimeleri tarafından gerçekleşir. Elektron transport zincirinde sitokrom oksidaz kompleksinin katılımıyla moleküler oksijen dört elektron alarak indirgenir ve iki molekül su oluşur. Normal şartlar altında oksijen radikalleri sitokrom oksidaz kompleksinden açığa çıkmazlar. Çünkü tüm ara basamaklar kararlıdır. Fosforilasyon için substrat eksikliği olduğu zaman mitokondride elektron kaçağı olur ve bunun sonucunda oksijen indirgenerek süperoksit anyon radikalini oluşturur. Buradaki radikal oluşumunun nedeni NADH-CoenzimQ reduktaz kompleksinden oksijene elektron sızıntısının olmasıdır.⁵ Coenzim Q'nun (Ubiquinon) indirgenmiş formu moleküler oksijeni süperoksit anyonuna indirger.

İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit anyon radikali oluşur.

1. 2. 2. Fagositoz

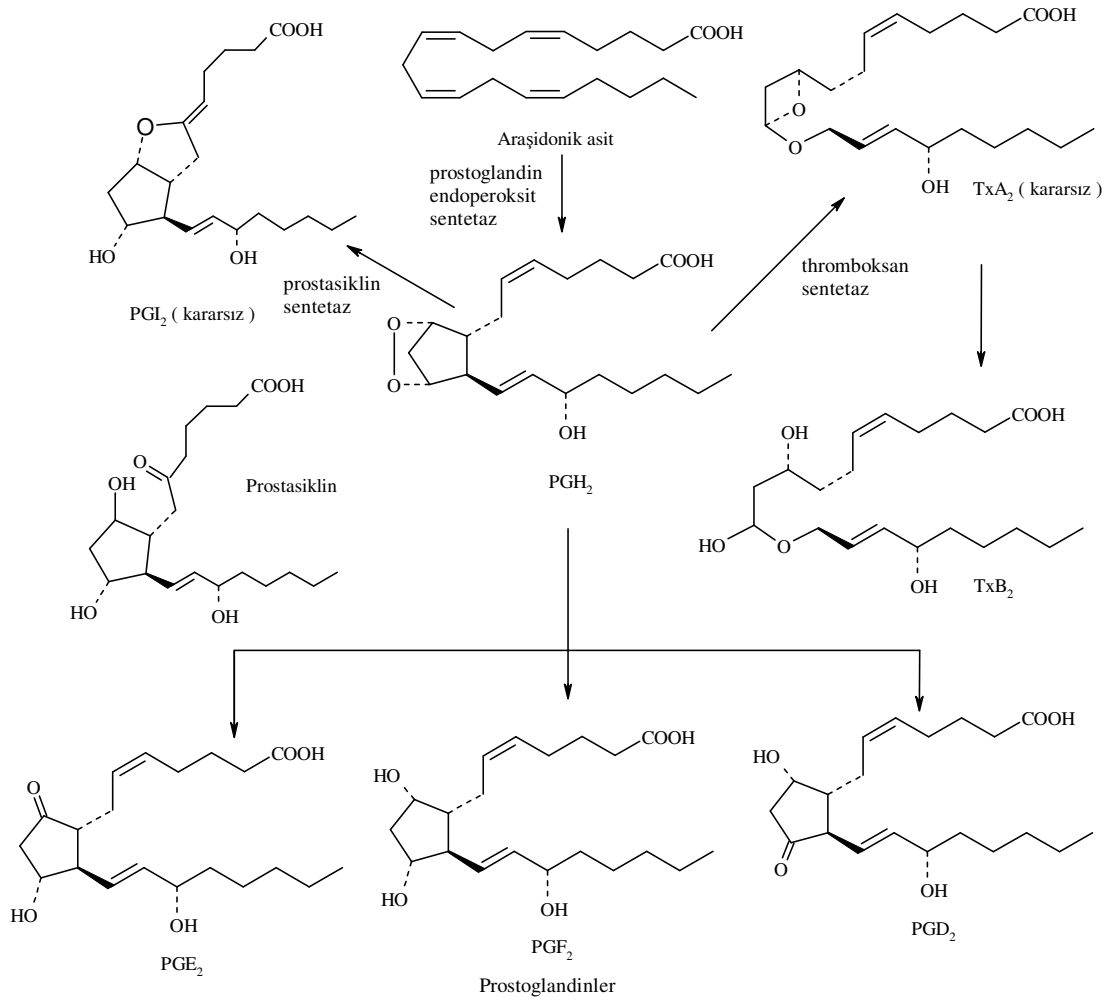
Aktif olmayan nötrofiller çok az oksijen tüketir. Çünkü glikojen bakımından zengindir ve glikoliz ile ATP oluşturabilirler. Bununla birlikte fagositoz esnasında aktif nötrofiller artan oksijen tüketimi gösterirler, bu oksijen tüketimi siyanid tarafından inhibe edilmez. Bu olay mitokondrial elektron transportu ile ilişkili değildir. Plazma membranında enzim kompleksinin (NADPH oksidaz kompleksi) aktivasyonu sonucu enzim miktarı artar.⁶ Pentoz fosfat reaksiyonlarından oluşan NADPH'nin yitilmesi ile moleküler oksijen süperoksit anyon radikaline indirgenir. SOD-H₂O₂ mikroorganizmalar üzerinde geniş spektrumlu öldürücü etkiye sahiptir.⁷ Yeşil heme grubu içeren bir enzim olan myeloperoksidaz nötrofillerde spesifik olmayan peroksidaz aktiviteye sahiptir ve hidrojen peroksiti substrat olarak kullanarak klorür iyonun

hipoklorit asite oksidasyonunu katalizler. Hipoklorit asit oldukça reaktiftir, bazı biyolojik molekülleri okside ederek bakterisidal etkiye neden olurlar.⁸

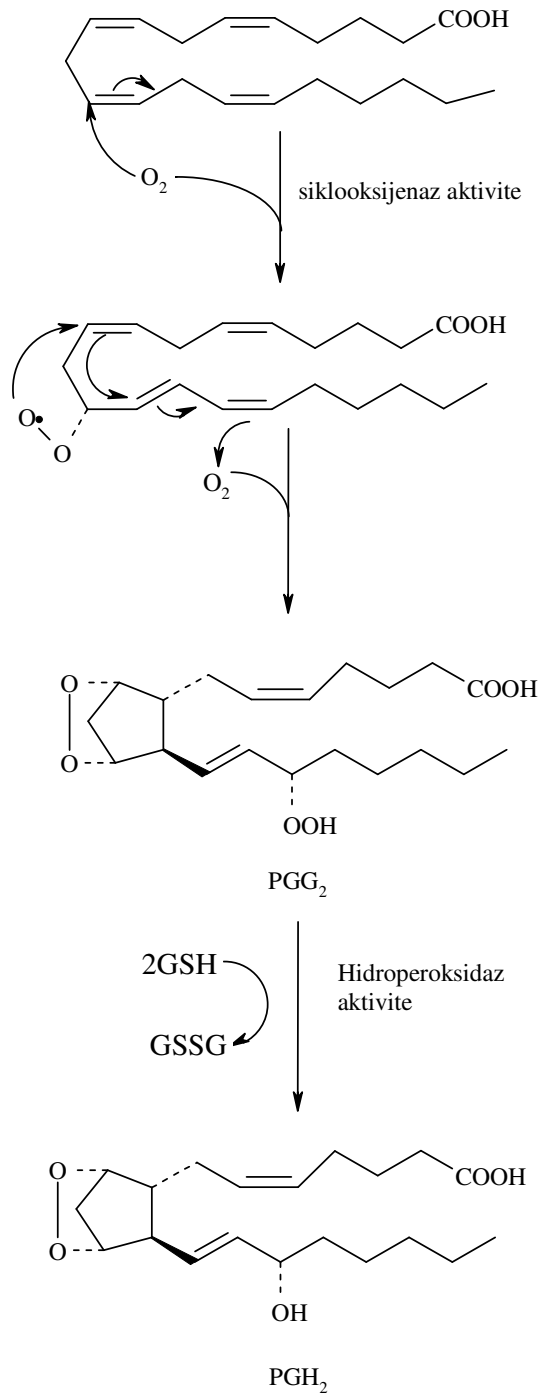
Fagositik yolla oksidantların üretimi fagositlerin bakterisidal aktiviteleri için önemlidir. Hipoklorit asit ve oksijen radikalleri birlikte nötrofillere saldırırlar ve enzimler açığa çıkar.⁹ Nötrofiller reaktif oksidantlara karşı bir savunma sistemine sahiptirler. Sitozolda CuZn-SOD ve mitokondrionda Mn-SOD içerirler. Nötrofiller aynı zamanda katalaz ve selenyum glutatyon peroksidaz (GPX) içerirler. Ancak bunlar dış etkiden oluşan süperoksit anyonlara karşı yeterli koruma sağlamazlar. Örneğin, kirlilik; silika partikülleri gibi asbest lifler pulmonary makrofajlar tarafından fagosite edilir ve stoplazmada proteolitik enzimlerin oluşmasına sebep olarak fagositik döngünün kırılmasına neden olurlar. Eğer makrofajlar öldürülürse zararlı partiküller alveoller etrafında toplanır ve serbest radikal reaksiyonları meydana gelir ve doku hasarı ile sonuçlanır.¹⁰

1. 2. 3. Eikosanoitlerin sentezi

Eikosanoitler sınıfına giren lökotrienler, tromboksan ve prostaglandinlerin sentezinde serbest oksijen radikalleri rol alır.¹¹ Siklooksigenaz, aynı zamanda prostaglandin endoperoksit sentetaz olarak bilinir, arşidonik asit molekülüne bir serbest radikal ara basamağı ile moleküler oksijen yerleştirerek (şekil 1.4) prostaglandin sentezinin ilk basamağını ve başka eikosanoitlerin sentezini katalizler (şekil 1.3). Bunun sonucunda iki endoperoksit PGG₂ ve PGH₂ oluşur. Hidroperoksidin bir kısmı enzimin aktif merkezindeki heme (Fe⁺³) grubu ile reaksiyona girerek, arşidonik asit molekülünden bir hidrojen atomu koparıp peroksil radikali oluşturur. Reaksiyon karışımından bir miktar lipit peroksidin uzaklaştırılması için GSH ve GPX'in ilave edilmesiyle, PGG₂ oluşumunun hızının azaldığı gözlenmiştir.¹² Yoksa lipit peroksidin fazlası siklooksigenazı inaktive eder. Bunun yanı sıra siklooksigenaz belli xenobiotikleri metabolize eder. Xenobiotikler oksijenle reaksiyona girerek oksijen radikalleri oluşturur.¹³



Şekil 1. 3 Arşidonik asit metabolizması ile tromboksan, prostasiklin ve prostaglandin sentezi



Şekil 1. 4. Serbest radikal ara basamağı ile prostaglandin sentezi

1. 2. 4. Mikrozomal elektron transport sistem

Sitokrom P-450 hem-protein grubunun bir üyesidir. Fe^{+2} -karbonmonoksit kompleksi 450 nm'de pik yapan spesifik absorban spektrumu verir. Endoplazmik retikulumda bulunurlar. Bu enzimler yapısal olarak farklı bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederler. Endojen ve eksojen sentezlenen birçok bileşik CYP-450 enzimlerinin substratı olarak görev yapar. Bu bileşikler; prostaglandinler, steroidler, ilaçlar ve diğer xenobiotiklerdir.¹⁴ Bu enzimler toksik maddelerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar. Aynı zamanda bu maddelerin metabolik aktivasyonundan sorumludurlar. Alkilme veya arilleme ara basamaklarıyla oldukça reaktif serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Bu reaktif serbest radikaller önemli hücrel makromoleküllerle reaksiyona girerek hücrel hasarlara neden olurlar.¹⁵

NADPH-sitokrom P-450 redüktaz üzerinden NADPH 'dan subsrata elektron transferi sırasında moleküler oksijene elektron kaçağı olabilir ve bunun sonucunda süperoksit anyon radikali oluşabilir.

1. 3. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin toksisiteleri

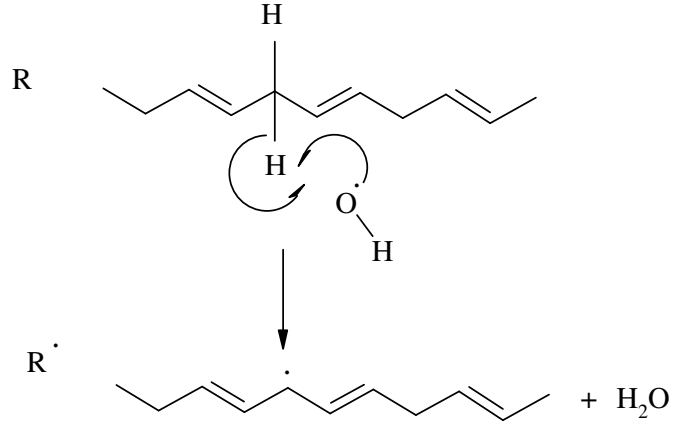
Reaktif serbest radikaller, lipitler, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi hücrel bileşenlere zarar verirler. Serbest radikaller çok kısa ömürlü oldukları için oksidatif hasar serbest radikal ara basamakları içeren zincir reaksiyonları tarafından gerçekleşir. Bir serbest radikal, radikal olmayan başka bir molekül ile reaksiyona girerek yeni bir serbest radikal oluşturular. Oluşan yeni serbest radikal de başka moleküllerle reaksiyona girerler. Lipit peroksidasyonu başlangıç serbest radikaller ile değil sekonder serbest radikaller üzerinden dokulara hasar verir.¹⁶

1. 3. 1. Lipit peroksidasyonu

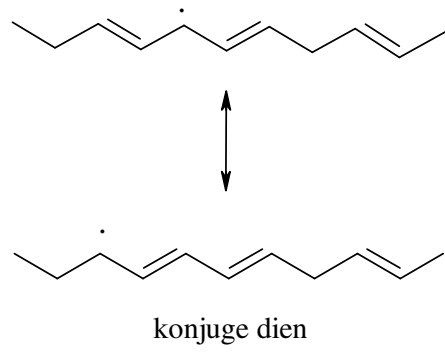
Lipit peroksidasyonu, poli doymamış yağların bozunması olarak tanımlanır.¹⁷ Lipit peroksidasyonu, hidroksi radikali tarafından metilen karbon atomundan bir hidrojen atomu koparılması ile başlar. Peroksidasyon reaksiyonu, mannitol¹⁸ veya format¹⁹ gibi hidroksi radikali söndürücüleri tarafından inhibe edilir. Süperoksit radikali lipit molekülünden bir hidrojen koparamaz, Fe^{2+} varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksi radikali oluşturur. Bunun yanı sıra süperoksit anyonun protonlanmış formu daha reaktiftir ve linoleik asit gibi bazı yağ asitlerinden hidrojen atomu koparabilir. Çünkü protanlanmış süperoksit anyon yüksüz hale gelir ve hücre membranından rahatça geçebilir ve lipitlerin alt hücresele organellerinde peroksidasyona neden olur.

Lipit molekülünün metilen karbonundan bir hidrojen atomu koparılması karbon merkezli bir radikal meydana getirir (şekil 1.5). Bu radikal moleküler düzenlemeyle konjuge dien oluşturarak kararlı hale gelir (şekil 1.6). Konjuge dien moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur (şekil 1.7). Lipit peroksil radikali başka lipit moleküllerinden bir hidrojen atomu koparır. Böylece zicir reaksiyonlarının başlamasına neden olurlar (şekil 1.8).

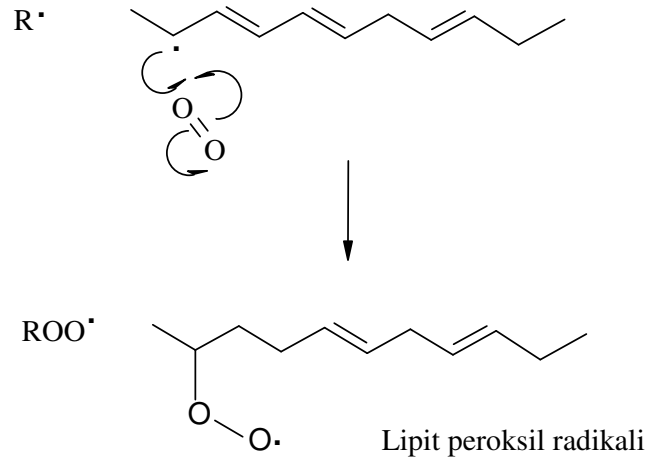
Lipit peroksidasyonu hücre membranının akışkanlığını etkileyerek, membran yapısında ve membran bileşenlerinde hasara yol açar.²⁰ Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit protein sentezini inhibe eder²¹ ve DNA bazları ile reaksiyona girer.²² (şekil 1.9).



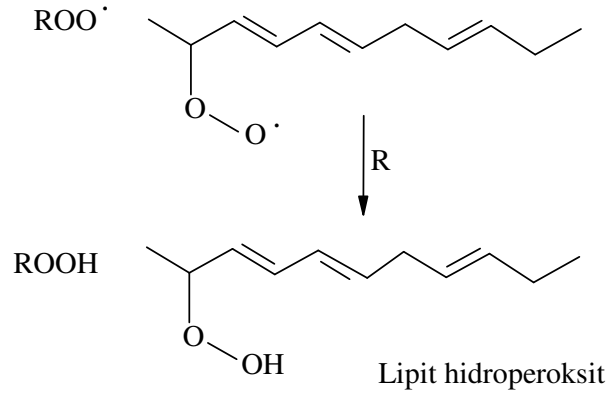
Şekil 1. 5. Lipit molekülünün metilen karbonundan bir hidrojen koparılması sonucu karbon merkezli lipit radikali oluşumu



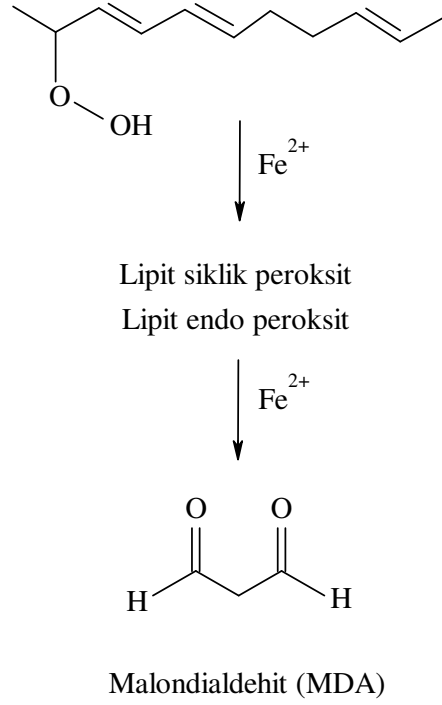
Şekil 1. 6. Moleküler düzenleme ile konjuge dien oluşumu



Şekil 1. 7. Konjuge dienin moleküler oksijen ile reaksiyona girip lipit peroksil radikali oluşturması

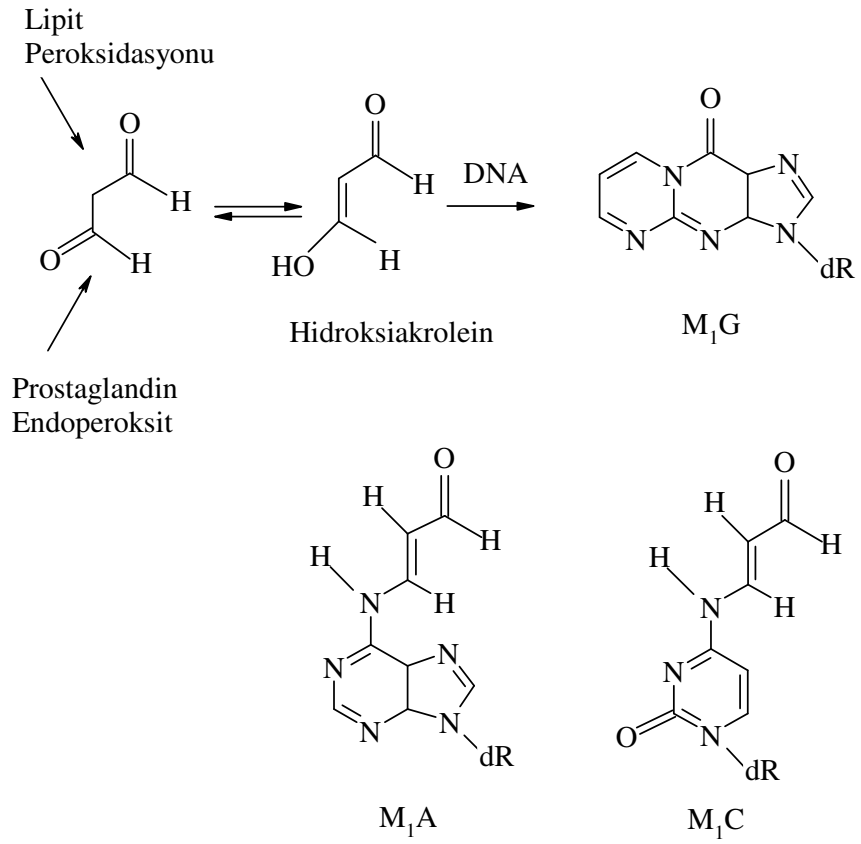


Şekil 1. 8. Lipit peroksil radikalının başka lipit molekülleri ile reaksiyona girmesi ve zincir tepkimelerini başlatması



Şekil 1. 9. Son ürünün oluşumu

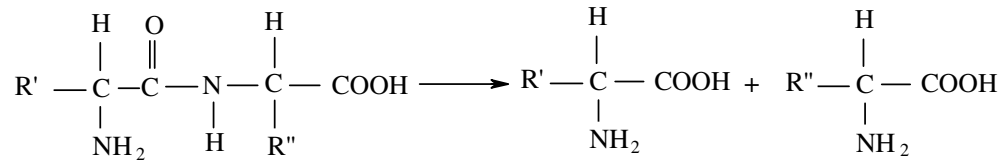
Malondialdehit (MDA) memeli hücrelerinde mutajeniktir ve sıçanlarda karsinojeniktir.^{23, 24} MDA, DNA bazları olan dG, dA ve dC ile reaksiyona girerek M_1G , M_1A ve M_1C ürünlerinin oluşumuna neden olur (şekil 1.10). M_1G , insan akciğerlerinde, beyaz kan hücrelerinde, pankreasta ve meme dokularında tespit edilmiştir.²⁵ Birkaç araştırmada M_1G 'nin genomda reaktif bir elektofil olduğu sonucuna varılmıştır.²⁶ N^2 -Oxo-propenil-dG, M_1G 'nin açık halkasının hızlı ve nicel bir ürünüdür ve elektrofilitir ancak DNA'nın hedef bölgesi M_1G 'den farklıdır. Bu yüzden N^2 -Oxo-propenil-dG ve M_1G 'nin interkonversiyonu DNA'nın çeşitli reaktif gruplarından açığa çıkabilir ve DNA-DNA zincirinde çapraz bağlanma veya DNA-protein çapraz bağlanma yapabilir.



Şekil 1. 10. Malondialdehitin (MDA) sentezi ve DNA bazları ile reaksiyon

1. 3. 2. Protein Denatürasyonu

Bir protein molekülünün bütün amino asit kalıntıları hidroksi radikalleri için potansiyel hedefdir. Ancak Tyr, Phe, Trp, His, Met ve Cys kalıntıları oksidasyona daha fazla duyarlıdır.²⁷ Aneorobik koşullar altında hidroksi radikali proteinlerde intrasellular ve intersellular olarak S-S bağları arasında çapraz bağlanma yapar. Aerobik koşullar altında, hidroksi radikali bazı amino asit kalıntılarının peptit bağını kırarak peptit zincirinin parçalanmasına neden olur.²⁸



Mitokondride ve kırmızı kan hücrelerinde endojen proteinlerin in-vitro parçalanması²⁹ hücrelerde oksijen radikalleri oluşumundan etkilenir.^{30, 31} Çünkü birçok proteinaz, okside proteinleri okside olmayan proteinlerden daha hızlı parçalar. Örneğin çoğu hayvansal dokular proteinlerin okside formunu parçalayabilen nötral alkalın proteazlar içerir. Ancak bu alkalın proteazlar okside olmamış proteinleri parçalayamazlar.³² Protein parçalanması iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta bazı amino asitler okside olur ve karbonil türevleri meydana gelir. İkinci basamakta, modifiye proteinler intrasellular proteazlar tarafından hızlı bir şekilde parçalanır. Okside olmuş proteinlerin parçalanması yararlı da olabilir. Çünkü sonra oluşabilecek oksidatif hasarı önleyerek proteinlerde çapraz bağlanma oluşumunu engeller. Proteolitik aktivite aynı zamanda yeni proteinlerin sentezi için amino asit sağlar.

1. 3. 3. Nükleik asitlerde oksidatif hasar

Serbest radikaller, nükleik asitlerde bulunan bazlara ve deoksiriboz şekere saldırarak hasara neden olurlar. Çift sarmal DNA'da heliksin dış kısımlarında yer alan deoksiriboz şekeri oksidasyona karşı çok duyarlıdır.³³ Oksidatif reaksiyonlar sonucunda

DNA zincirinde çapraz bağlanma meydana gelir ve bunun sonucunda genetik bilginin transkripsiyonu değişir.Yüksek konsantrasyonlardaki oksijen serbest radikalleri DNA zincirinin kırılmasına neden olurlar. DNA oksidasyonu mutasyona ve kanserojenik etkiye neden olur.³⁴ Mutasyon, hasarlı DNA zincirinin replikasyonu sırasında meydana gelir. DNA polimeraz bir lezyonla karşılaştığında veya enzim zincirdeki modifiye genetik bilgiyi yanlış okuduğunda replikasyon bloke edilir. Replikasyon bloke edilmezse hatalı yeni zincir oluşur.³⁵

1. 4. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar

Sayırsız hastalığın patogeneğinde reaktif serbest radikaller rol alır. Yaşlanma ve beraberinde getirdiği nrodejenerativ hastalıklar ve kanser serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarla ilişkilidir. Bugüne kadar serbest radikallerin neden olduğu 60'ın üzerinde hastalık bilinmektedir. Burada sadece birkaç önemli hastalığa yer verilmiştir.

1. 4. 1. İnflamasyon hastalıkları

Fagositoz, yabancı partiküllerin plazma membranına alındıktan sonra fagositik hücreler tarafından yutulmasıdır. Fagositoz, nötrofiller ve makrofajlar ile gerçekleştirilir. Aktive olmayan nötrofiller çok az miktarda oksijen tketrirler çünkü ATP üretimini glikoliz ile gerçekleştirirler. Buna karşın makrofajlar oksidatif fosforilasyon yapar ve bu yüzden fazla oksijen tketrirler. Ancak fagositoz esnasında her iki hücrede de oksijen miktarı artar. Bu, NADPH oksidaz enzim kompleksinin aktivasyonundan kaynaklanır, oksijeni süperoksit anyona indirger. Süperoksit anyonun dismutasyonu ile hidrojen peroksit oluşur. Daha sonra fenton reaksiyonu ile hidroksi radikali meydana gelir. Hidrojen peroksit varlığında myeloperoksidaz klor iyonunu hipoklorür iyon oksitler. Hipoklorr iyon güçlü bir oksidant özelliğe sahiptir ve birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girer.

Daha önce de tanımlandığı gibi serbest radikaller fagositlerden açığa çıkarlar ve komşu dokularda oksidatif hasara neden olurlar. Serbest oksijen radikalleri ve bazı fagosit türevli faktörler kılcal damar duvarının geçirgenliğini artırır ve nötrofillerin hızlı

bir şekilde döngüden çıkmasına neden olurlar.³⁶ Nötrofiller inflamasyon bölgesinde birikince, oksijen radikalleri endotel kökenli hücrelerde hasara neden olurlar. Daha sonra hidroksi radikalleri hücre yüzeyindeki karbohidratlara saldırır, süperoksit anyonu ise eritrosit membranını geçerek hemoglobin ile reaksiyona girer ve hemoliz gerçekleşir.³⁷

Nötrofillerin eklemlerde birikmesiyle oluşan hidroksi radikalleri polimer hyaluronik asiti parçalayarak eklem sıvısının vizkozitesinin azalmasına neden olurlar.³⁸ Buna bağlı olarak sürtünmenin artmasıyla eklem sızısı meydana gelir.

1. 4. 2. Ateroskleroz

Başlangıç ateroskleroz ile kandaki yüksek kolesterol seviyesi arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir.³⁹ Kolesterol damar çeperlerinde toplanır ve özellikle lipoproteinler ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerden (LDL) oluşur. Ateroskleroz gelişmesinde LDL'nin oksidatif modifikasyonu kritik bir olaydır. Goldstein ve ark., LDL'nin oksidatif modifikasyonunun makrofajlar içine alınmasının bir sonucu olduğunu göstermiştir.^{40, 41}

Goldstein ve Brown LDL reseptör yolunu bulmuşlar ve bu yolun makrofajlar tarafından LDL alınmasından sorumlu olduğunu göstermişlerdir.⁴² Bu reseptörler yoluyla hücre içine alınan kolesterol miktarı sınırlıdır ve makrofaj hücre kültürü ortamına LDL eklendiğinde makrofajların kolesterol ester birikimi yaratacak kadar çok miktardaki LDL'yi almadıkları saptanmıştır. Bu gelişmelerden sonra Goldstein, makrofajların aşırı miktarda LDL alması ve kolesterol birikimi olması için LDL'nin modifiye olması gerektiğini öne sürmüştür. Daha sonra LDL'nin kimyasal bir türevi olan asetillenmiş LDL'nin makrofajlar tarafından aşırı şekilde alındığı ve bu olayda çöpçü reseptör olarak adlandırılan başka bir reseptörün rol oynadığı ortaya çıkmıştır.⁴³

Lipit peroksidasyonu sonucunda yağ asit zincirleri kırılır ve reaktif olan aldehitler, ketonlar ve diğer oksitlenmiş ürünler (oksisiterol türevleri) apoprotein B veya fosfolipitlerle kompleks oluşturabilirler. Apo-B ile oluşan kompleks sonucu LDL'nin reseptörüne bağlanma yeteneği azalır ve LDL partikülü çöpçü reseptör tarafından alınmaya başlar. İleri dönemlerde monositler endotel hücrelerine yapışıp makrofajlar haline dönüşürler, daha fazla kolesterol biriktirerek köpük hücreleri şekline dönüşürler.

LDL'nin oksidasyonu, inflamasyon moleküllerinin ve kemotaktik faktörlerin oluşumuna neden olarak ateroskleroz gelişimine yol açar.⁴⁴

1. 4. 3. Kanser

Kanser gelişimi, gittikçe artan mikroevrimsel işlemler gerektirir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki kanserojenler serbest radikalleri içermektedir.⁴⁵ Serbest radikaller, somatik hücrelerde DNA mutasyonu gerçekleştirerek (başlangıç aşaması), tümörojenik hücrelerin yayılmasını hızlandırarak (gelişme aşaması) ve malignant tümörlerin kansere dönüştürerek (ilerleme aşaması) tüm aşamalarda kanser gelişimini tetiklerler.

Karsinogenezin ilk basamağı DNA'nın dönüşümsüz modifikasyonu ile başlar. Hasarlı DNA, vital hücrelerin korunma mekanizmaları tarafından onarılabilir. Bununla birlikte, az miktarda modifiye DNA, onarım proseslerinden kaçabilir ve mutajenik etki yaratabilir. Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikal üretimi, muhtemel DNA lezyonlarını ve dolayısıyla mutagenезleri artırır.⁴⁶

DNA oksidatif hasarı kimyasal veya yapısal olabilir.⁴⁷ Hidroksi radikali DNA molekülünün tüm komponentlerine, deoksiriboz omurgasına, pürin ve pürimidin bazlarına saldırır. Hidroksi radikallerinin deoksiriboz ile kimyasal reaksiyonu sonucu pürin ve pürimidin bazları açığa çıkar. Bu DNA baz ürünleri DNA'da mutajenik abazik bölge meydana getirirler. Hidroksi radikali pürin ve pürimidin bazlara saldırarak çeşitli serbest radikal ürünleri oluştururlar. En yaygın oksidatif DNA bazı 8-hidroksideoksiguanozindir, normal insan hücrelerinde yaklaşık olarak 10^5 guanidin kalıntısından bir tanesi 8-hidroksideoksiguanozine dönüşür.⁴⁸ 8-hidroksideoksiguanozin-deoksiadenozin hatalı çiftleşmesi sonucu olarak GC baz çifti TA baz çiftine dönüşür.⁴⁹

Serbest oksijen radikalleri tümör oluşumunda önemli bir rol oynarlar. Ekstrasellüler Ca^{2+} 'nin ve intrasellüler Ca^{2+} hareketliliğinden artan sitosolik kalsiyum iyonları tümör oluşumunu tetiklerler.⁵⁰ Yüksek konsantrasyonlarda intrasellüler Ca^{2+} , proteinkinaz C ve S6-kinaz gibi diğer protein kinazları aktive eder. Hem Protein kinaz hem de S6-kinaz, çeşitli fosforilasyon olaylarında transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenlerler ve bunun sonucunda hücre çoğalmasını etkilerler.

Karsinogenezin son basamağında, kontrolsüz büyüme, bağışıklık denetiminden kurtulma, doku istilası ve metastazi gibi malignant özellikler gelişir.⁵¹

1. 4. 4. Yaşlanma

Yaşlanmanın doğasını açıklamak için birçok teori ileri sürülmüştür. Yaşlanmanın serbest radikal teorisi ilk kez Harman tarafından yayımlanmıştır.¹ Teoriye göre aerobik metabolizma oksijen serbest radikallerini üretir ve bu reaktif türler oksidatif hasara neden olur. Oksidatif hasar yaşla artar ve sonunda ölüme neden olur.

Oksijen aerobik metabolizma için çok önemlidir ve bununla birlikte oksijen radikallerinin üretimi kaçınılmazdır ve hücrel organellere zarar verirler. Ne kadar uzun yaşarsak o kadar fazla oksijen serbest radikallerine maruz kalırız ve makromoleküllerde o kadar fazla oksidatif hasar meydana gelir. Bunun sonucunda kanser, kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistem bozuklukları gibi dejeneratif hastalıklar gelişir.⁵²

Birçok çalışma, yaşlanmada oksijen serbest radikallerinin önemli rolünü desteklemiştir. Maksimum hayat süresi genetik faktörler ile belirlenir. Ancak diet gibi çevresel etmenlerle bu süre modifiye edilebilir. Harman, diette ek antioksidant alımıyla birçok türde yaşam süresinin %20 arttığını ileri sürmüştür.⁵³ Uzun ömürlü hayvanların yüksek antioksidant seviyesine sahip oldukları gösterilmiştir.⁵⁴ İnsan yaşlılığı üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki, sağlıklı yaşlıların GSH seviyeleri, erken yaşlanma gösteren akranlarından daha fazladır.^{55, 56}

Lipofuskinler, intrasellular olarak biriken pigmentlerdir. Bu pigmentlerin sayısı ve boyutu yaşla birlikte artar. Lipofuskinler, lipit ve protein oksidasyonunun son ürünlerini içerirler. Beslenmelerinde yetersiz α -tokoferol veya fazla doymamış yağ asitleri tüketen hayvanlarda lipofuskin seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir.^{57, 58}

Yaşlanmanın serbest radikal teorisi, daha sonra daha spesifik olan mitokondrial serbest radikal teorisiyle geliştirilmiştir.⁵⁹ Mitokondri sadece memeli hücrel organelidir ve kendi DNA'sına sahiptir. Mitokondrial DNA, mitokondrial fonksiyonlarda kritik bir rol oynar. mtDNA'nın mutasyon hızı nükleer DNA'dan daha fazladır. Çünkü mtDNA serbest radikal üretim kaynağına daha yakındır.

Mitokondri, serbest radikal kaynaklı hasarın önemli bir hedef noktasıdır ve bu yaşlanmayla yakından ilgilidir. Bu hipotez şu araştırmalarla desteklenmiştir. 1) lipofuskinler mitokondri membranından açığa çıkarlar;⁶⁰ 2) serbest radikaller, radikal üretimin olduğu bölgeye daha çok hasar verirler;⁶¹ 3) yaşam süresi değişik türlerde metabolik hıza bağlı olarak farklılık gösterir;⁶² 4) uzun ömürlü türler az mitokondrial lipid peroksidasyonuna sahiptirler.⁶³

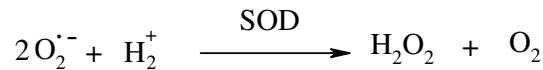
Mitokondride antioksidant korunmanın artması yaşlanma işlemlerini geciktirir. Mitokondrial DNA mutasyonunun önlenmesi hücrenin solunum kapasitesini korur ve yaşlanmanın gecikmesi için bir avantaj oluşturur.

1. 5. Endogenos antioksidant savunma

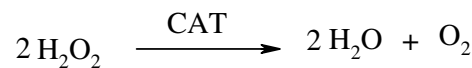
Biyolojik antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edici substratlarla yarışarak oksidasyonu önleyen maddelerdir.⁶⁴ Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyerek ya da serbest radikalleri söndürerek çalışır. Küçük moleküller serbest radikalleri nötralize eder, enzimler serbest radikallerin reaksiyonlarını inhibe eder, metal şelatlayıcılar katalitik olarak aktif olan demir iyonlarını tutar ve daha fazla serbest radikal oluşumunu engeller.

1. 5. 1. Enzimlerle antioksidant koruma

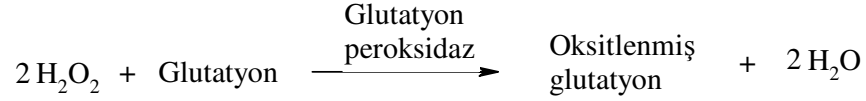
Süperoksit dismutaz farklı prostetik gruplar içeren metaloprotein grubunun bir üyesidir.⁶⁵ Süperoksit anyonun hidrojen peroksit dismutasyonunu katalizler.



Katalaz, hidrojen peroksiti suya ve oksijene indirgeyerek reaktif hidroksi radikallerinin oluşumunu engeller.



Selenyum-glutatyon peroksidaz (GPX), hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin ayrışmasını katalizler. GPX yüksek substrat affinitesine sahiptir. Mitokondriden peroksitlerin eliminasyonu için önemlidir.⁶⁶



Glutatyon, S-transferazlar ailesinin bir üyesidir ve çoğu peroksidaz aktivite gösterir. Lipit hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizler ancak hidrojen peroksit için aynı şeyi yapmaz. Bunun yanı sıra elektrofilik xenobiotiklerin konjugasyonunu katalizlerler.

1. 5. 2. Serbest radikal söndürücüler ile antioksidant koruma

Biyolojik sistemimizde serbest radikaller ile direkt reaksiyona girecek veya antioksidant enzimler için co-substrat olarak davranacak birkaç tür küçük molekül vardır. GSH, vitamin C, vitamin E iyi bilinen örneklerdir.

GSH ve vitamin C, plazmada ve hücre sitozolda etkili radikal söndürücülerdir. Vitamin E, lipit fazlarda özellikle hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinde antioksidant koruma sağlar. GSH, vitamin C ve vitamin E antioksidant korumada sinerji yaratırlar.^{67,68} GSH ve vitamin C sitozolde bulunurlar ve serbest radikallerin söndürülmesinde ilk korumayı sağlarlar. GSH, vitamin C'nin okside formu olan dehidro-askorbik asitten yeniden oluşumuna yardımcı olur.⁶⁹ Vitamin E hücre membranında bulunur ve lipit peroksidasyon reaksiyon zincirinin kırılmasında oldukça etkilidir. Vitamin C ve GSH, lipit tabakasında direkt radikale etki ederek lipit peroksidasyonunu inhibe edemezler. Tokoperoksil radikalden vitamin E oluşumu döngüsünü sağlayarak antioksidant etki gösterirler.

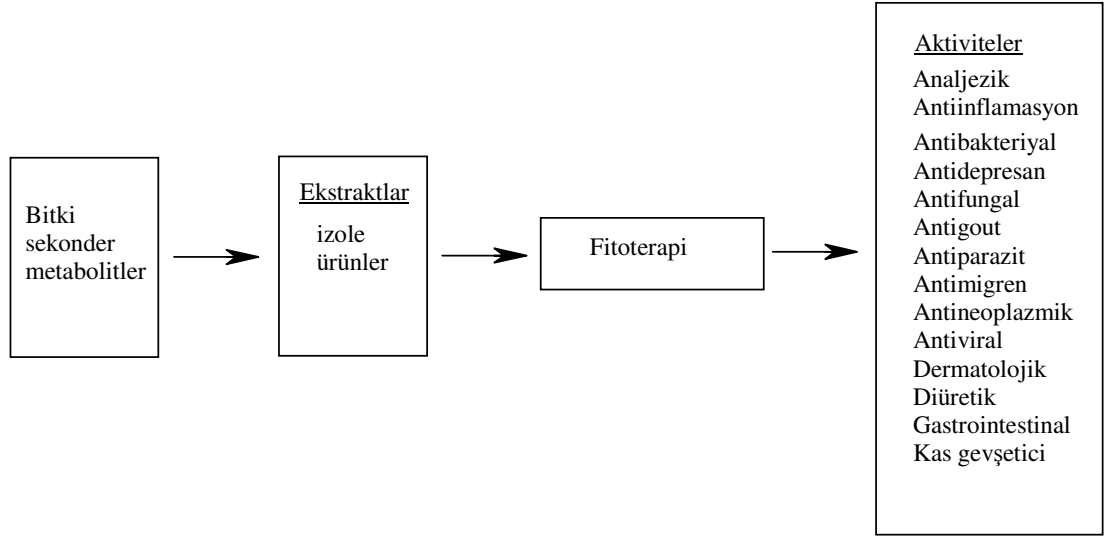
1. 5. 3. Metal iyonlarıyla antioksidant koruma

Bazı antioksidant enzimler fonksiyonel redoks merkezleri olarak az miktarda metallere ihtiyaç duyarlar. Örneğin SOD'un sitosolik formu çinko veya bakıra, mitokondrial formu manganeze ihtiyaç duyar. Selenyum GPX'in fonksiyonu için çok önemlidir. Yani az miktarda metaller antioksidant bileşen olarak davranırlar. Bununla birlikte fazla miktarlarda metal iyonları özellikle demir ve bakır iyonları Fenton reaksiyonu ile hidroksi radikali oluşumuna neden olurlar. Bu iyonlar metal şelatlayıcılar tarafından tutulurlar ve katalitik etkileri inhibe edilir. Metalotioninler, albumin, ürik asit, transferin ve seruloplazminler biyolojik sistemdeki bazı metal şelatlayıcılardır.

1. 6. Bitkilerde bulunan antioksidantlar

Bitkiler, ekosistemde büyümek, gelişmek, ve korunmak için farklı sekonder metabolitler üretirler.^{70,71} Şimdiye kadar aydınlatılan 100.000'e yakın bitki sekonder metaboliti vardır. Bu sekonder metabolitlerin en önemli üç kimyasal grubu terpenler (lipitlerin bir grubu), fenolikler (karbohidrat tüevleri) ve alkaloidlerdir (amino asit tüevleri). Güçlü bir antikanser ilaç olan taksol bir terpen yapısındadır. Fitoaleksin ve resveratrol fenoliklere örnek sekonder metabolitlerdir. Çay, meyve ve kırmızı şarapta bulunan flavonoidler ve tanninler sağlık üzerine önemli etkileri olan fenolik bileşenlerdir. Alkaloidler tıbbi olarak kullanılan bitki sekonder metabolitlerinin en önemli sınıfıdır. Hücre membranını hızlı bir şekilde geçebilme yeteneklerinden dolayı güçlü farmakolojik etki gösterirler. Nikotin, fizyolojik bağımlılık yapan önemli ticari bir alkaloiddir. Kafein, çay ve çikolata merkezi sinir sisteminde uyarıcı etkiye sahip alkaloidlerdir. Afyon bitkisi morfin ile birlikte 25'in üzerinde alkaloid içerir ve çok etkili ağrı kesicidir. Vinkristin ve vinblastin güçlü antineoplastik etki gösteren alkaloidlerdir, Hodkins hastalığının ve diğer lenfomaların tedavisinde kullanılır.

Sekonder metabolitler, sağlık üzerine sayısız pozitif biyolojik aktivite sergilerler. Antibakteriyel, antikanser, antifungal ve antioksidant aktiviteler (şekil 1.11.) bunlardan önemli olanlarıdır. Bitki sekonder metabolitlerinin farmakolojik değeri, sağlık üzerindeki önemli rollerinin keşfedilmesiyle artar ve yeni ilaçların gelişmesine öncülük eder.⁷²



Şekil 1.11. Bitki sekonder metabolitlerin insan sağlığı üzerindeki biyolojik aktiviteleri

1. 6. 1. Bitki sekonder metabolitlerinin kimyası

Sekonder metabolit yapım blokları, primer metabolitlerden türerler. Sadece sınırlı sayıda bloklarla bile geniş sekonder metabolitler üretilir. Sekonder metabolitlerin biyosentezinde kullanılan en önemli bileşikler, asetil koenzim A, şikimik asit, mevalonik asit ve 1-deoxyxylulose 5-fosfattan türerler. Sekonder metabolitler aynı tip birkaç bileşiğin kombinasyonu ile veya farklı tiplerin karışımı ile sentezlenirler. Çoğu sekonder metabolitler bir veya daha fazla şeker içerirler, ya basit primer metabolitler (glikoz gibi) ya da modifiye ve yaygın olmayan şekerler. Şekil 1.12.'de primer metabolitlerden sekonder metabolitlerin yapım bloklarının oluşumu gösterilmiştir.

1. 6. 2. Bitkilerin önemli antioksidant bileşenleri

Yararlı antioksidant fitokimyasallar birkaç kategoriye ayrılmıştır.⁷³ (şekil 1.13, şekil 1.14.)

1. 6. 2. 1. Fenoller ve fenolik asitler

Fenolik maddeler doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluştururlar.^{74,75} Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidantlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir.⁷⁶

1. 6. 2. 2. Quinonlar

Quinonlar iki keton içeren aromatik halkalardır, proteinlerdeki nükleofilik amino asitlerle dönüşümsüz kompleks oluştururlar.⁷⁷ Mikrobiyal hücrelerdeki hedef bölgeleri, membrana bağlı enzimler ve hücre duvarında bulunan polipeptitlerdir. Hypericin, bir antraquinondur, antidepresan ve antimikrobiyal olarak kullanılır.⁷⁸

1. 6. 2. 3. Flavonler, flavanoidler ve flavonoller

Flovenler bir karbonil grup içeren fenolik yapılardır, 3-hidroksi grubun eklenmesiyle flavonoller oluşur. Flavanoidler ise hidrosillenmiş fenolik bileşenlerdir, antioksidant özelliğın yanında mikrobiyal infeksiyonlara karşı koruma için bitkiler tarafından üretilir.⁷⁹ Antimikrobiyal aktiviteleri, ekstrasellular proteinlerle ve bakteriyel hücre duvarlarıyla kompleks oluşturmalarından kaynaklanır. Katekinler, flavanoidlerin indirgenmiş formudur, yeşil çayda bulunur antimikrobiyal ve antioksidant özellik gösterirler.⁸⁰

1. 6. 2. 4. Tanninler

Tanin polimerik fenolik grupların genel tanımlayıcı bir adıdır. Hemen hemen tüm bitkilerde bulunur. Fagositik hücreleri uyarma, geniş antiinfektif aktivite ve antitümör aktivite fizyolojik aktiviteleri olarak sayılabilir.

1. 6. 2. 5. Kumarinler

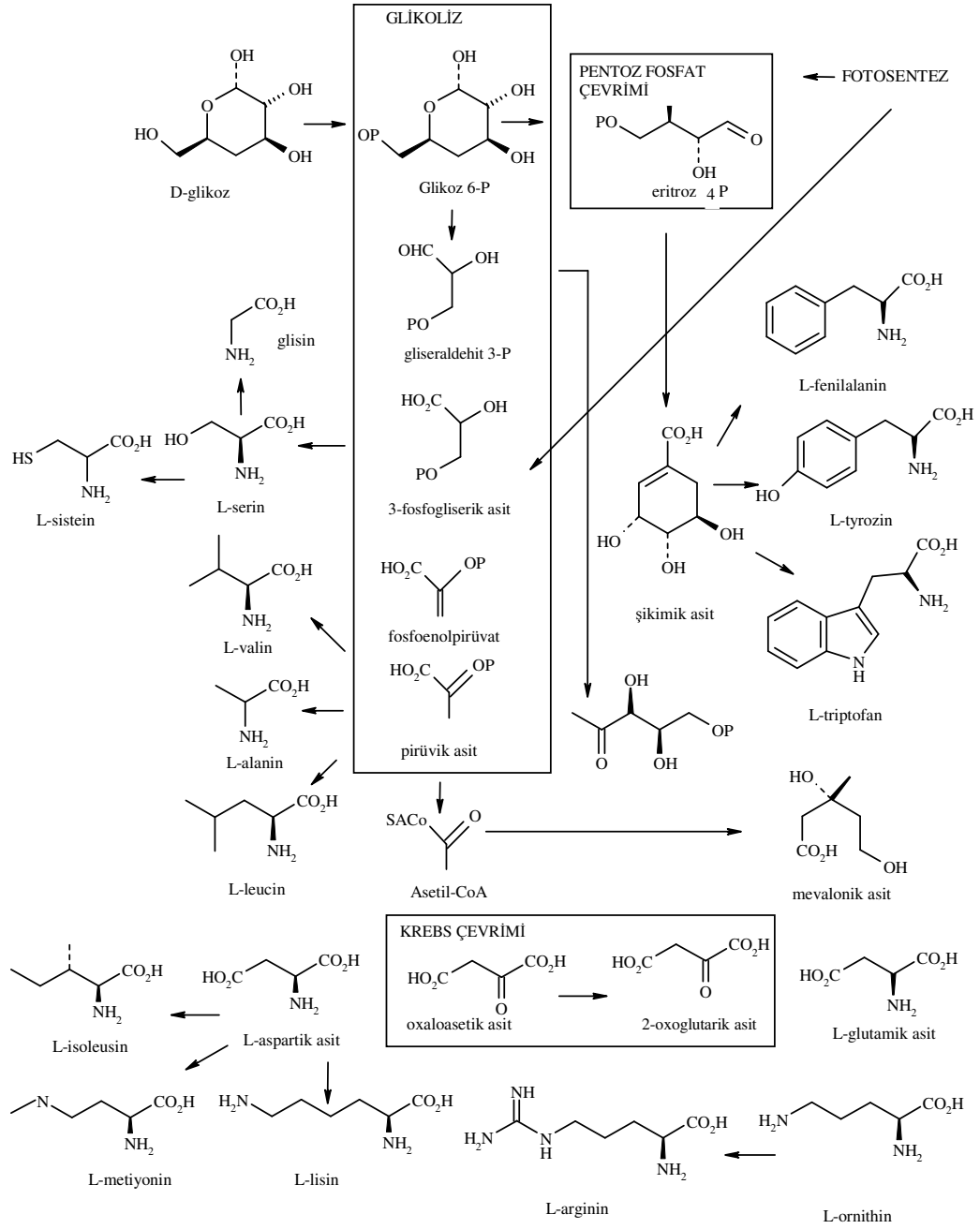
Kumarinler, benzen ve α -piron halkasından meydana gelmiş fenolik bileşenlerdir. Warfarin iyi bilinen bir kumarindir, antikoagulant olarak kullanılır. Kumarinler makrofajları uyarak infeksiyon üzerinde indirekt negatif etki yapar.⁸¹

1. 6. 2. 6. Terpenoidler

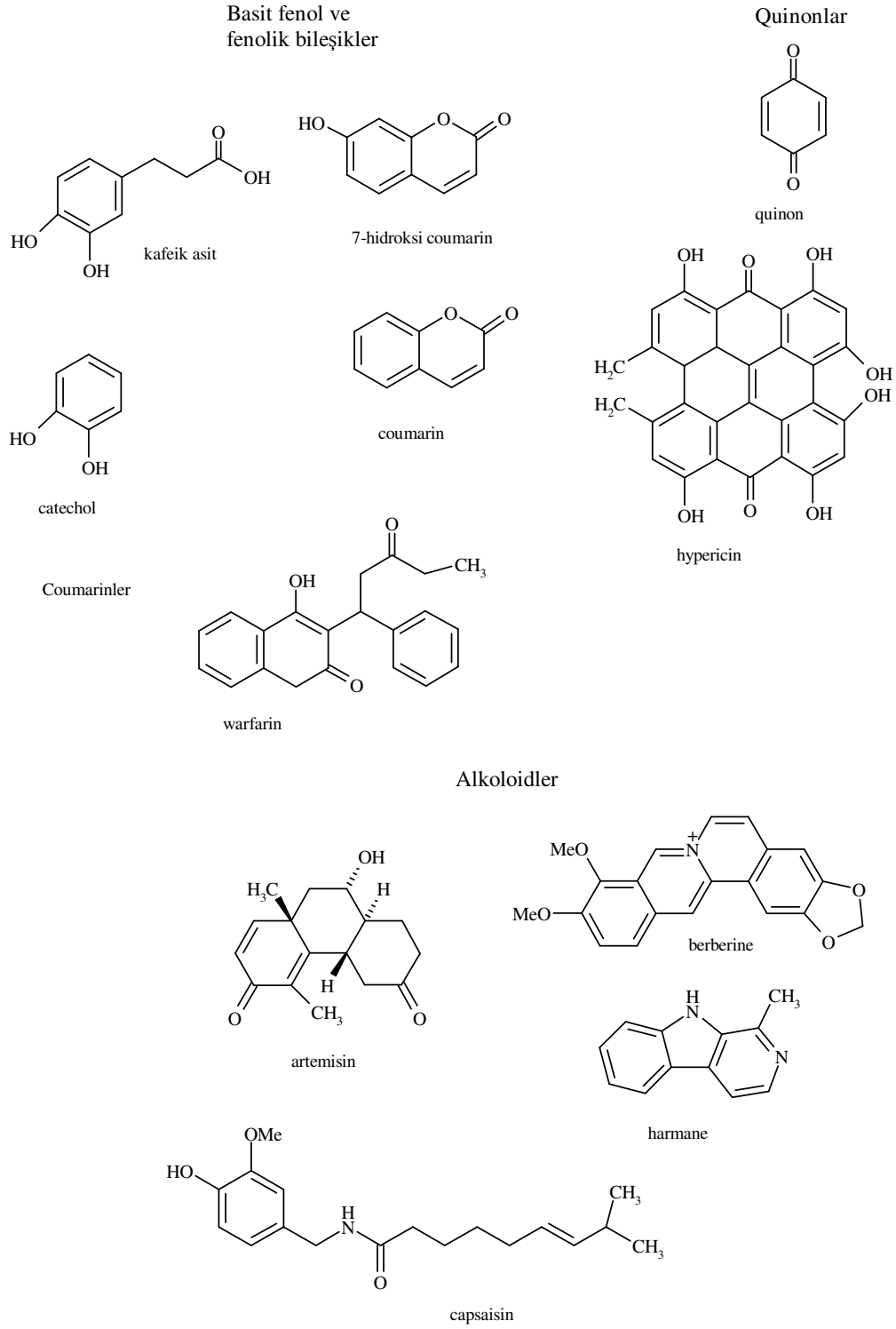
Terpenler olarak adlandırılırlar, genel kimyasal yapıları $C_{10}H_{16}$ 'dır. Diterpen, triterpen ve tetraterpen (C_{20} , C_{30} , C_{40}), hemiterpen (C_5) ve sesquiterpen (C_{15}) olarak bulunurlar. Bileşik, ek bir element genellikle oksijen içerdiğinde terpenoid olarak adlandırılır. Genel terpenoidlere, mentol ve kamfor (monoterpenler) ve farnesol ve artemisin (sesquiterpenler) örnek verilebilir. Terpenler ve terpenoidler, bakteri mantar ve virüslere karşı aktivite gösterirler.

1. 6. 2. 7. Alkoloidler

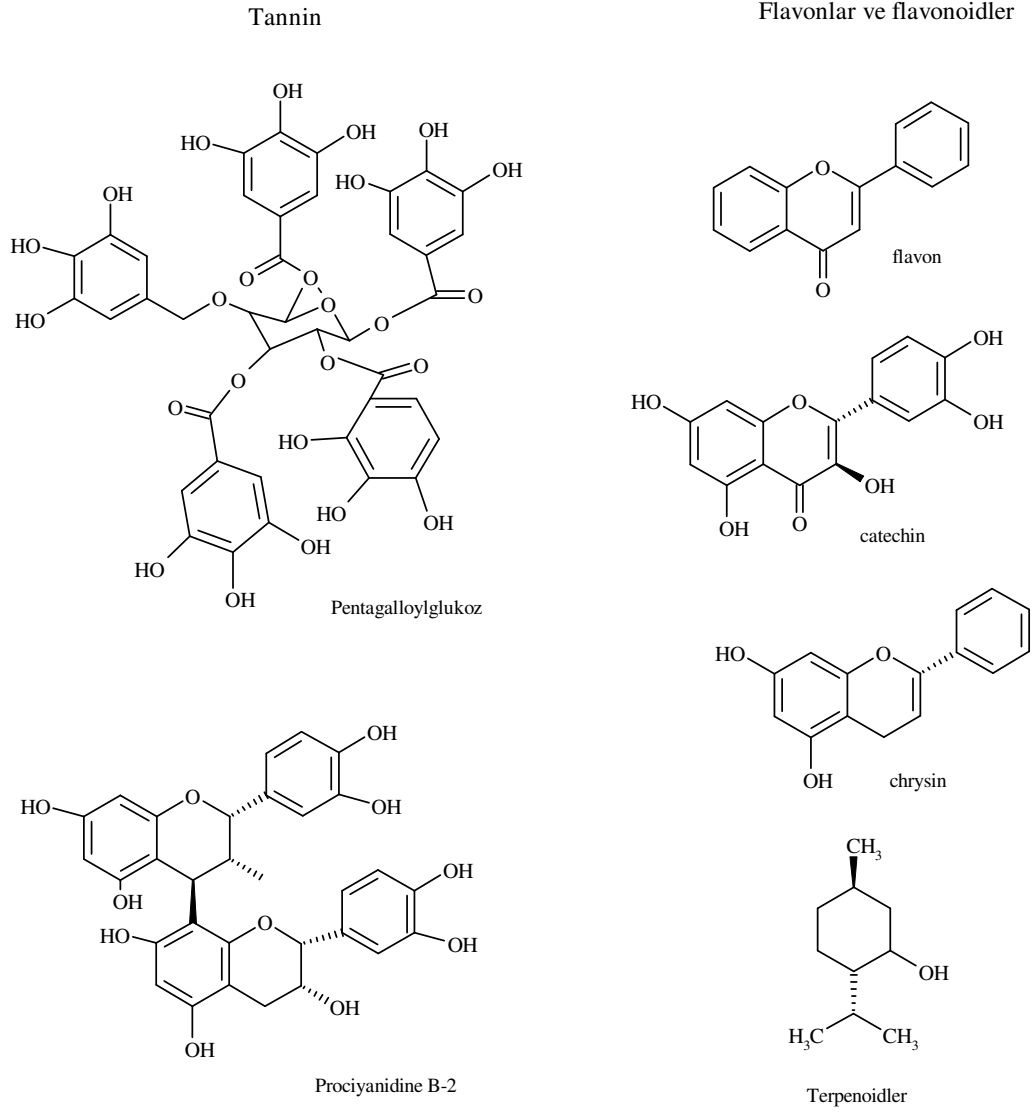
Alkoloidler heterosiklik nitrojen bileşikleridir. Morfin, kodein ve heroin alkoloidlere iyi birer örnektirler. Berberin gibi aromatik quaterner alkoloidler DNA ile interkalasyon yaparak aktivite gösterirler.⁸²



Şekil 1. 12. Primer metabolitlerden sekonder metabolitlerin oluşumu.



Şekil 1. 13. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal ve antioksidant özellik gösteren sekonder metabolitler.

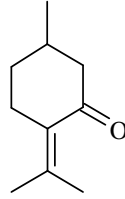


Şekil 1. 14. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal ve antioksidant özellik gösteren sekonder metabolitler.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Cyclotrichium cinsi Türkiye’de 2’si endemik 6 tür ile temsil edilir. Bu türler *Cyclotrichium niveum*, *Cyclotrichium organifolium*, *Cyclotrichium leucotrichum*, *Cyclotrichium stamineum*, *Cyclotrichium glabrescens* ve *Cyclotrichium longiflorum*’dur.⁸³ Yapılan literatür taramalarında bu türe ait sınırlı sayıda çalışma yapıldığı tespit edildi.

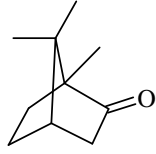
Başer ve ark., *C.niveum* bitkisinin dal, yaprak ve çiçek kısımlarının su destilasyonu ile esansiyel yağlarını elde edip, GC ve GC/MS ile kimyasal analizini yapmışlar. Aydınlatılan bileşenler yağın %97.30-98.40’ünü oluşturmaktadır. En önemli bileşen pulegon (%32.50-56.40) ve izometon (%35.40-34.20) ’dur.⁸⁴



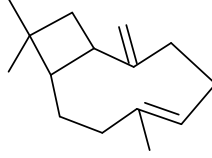
Pulegon

Başer ve ark., Türkiye’nin dört farklı bölgesinden topladıkları endemik bir tür olan *C.organifolium* bitkisinin su destilasyonu ile esansiyel yağlarının GC ve GC/MS analizlerini yapmışlar. Cis-izopulegon (%3.52-52.17), pulegon (%6.85-37.15), izometon (%1.98-30.67) ve izomentol (%0.28-11.22) aydınlatılan önemli bileşenleridir.⁸⁵

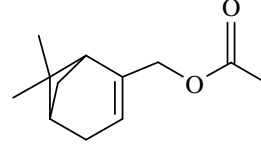
Yine Başer ve ark., mikrodistilasyon tekniği ile *C.leucotrichum* ve *C. stamineum* bitkilerinin esansiyel yağlarını GC/MS ile araştırmışlar. Temel bileşenlerin, *C.leucotrichum* için β -karyofenilen (%14.00), kamfor (%12.00), ve p-menth-3-en-8-ol (%11.00) ve *C.stamineum* için pinokamfon (%33.00), izopinokamfon (%13.00) ve miritinil asetat (%9.00) olduğu tespit edilmiştir.⁸⁶



Kamfor



Karyofenilen



Miritinil aseatat

Tepe ve ark., *C. origanifolium* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücü sistemleriyle hazırlanan ekstraktlarının ve esansiyel yağlarının antimikrobiyal ve antioksidant aktivitelerini in vitro olarak araştırmışlar. Esansiyel yağı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterirken diğer polar olmayan ekstraktlar ve alt fraksiyonları ılımlı antimikrobiyal aktivite göstermişler ancak polar ekstraktlarının neredeyse hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve β -karoten-linoleik asit testleriyle antioksidant aktiviteleri incelenmiş olup, polar ekstraktlar, polar olmayan ekstraktlara göre daha fazla serbest radikal söndürme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.⁸⁷

Bu çalışmaların dışında *Cyclotrichium* türünün kimyasal kompozisyonuna ve biyolojik aktivitesine dair herhangi bir yayına rastlanılmadı. *C. niveum* bitkisinin tüm kısımlarının (dal+yaprak+çiçek) antioksidant ve radikal söndürücü özelliklerine ilk kez bakıldı.

3. MATERİYAL VE METOT

3. 1. MATERİYAL

Bu çalışmanın materyalini oluşturan bitki örneği Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından toplandı ve teşhis edildi. Teşhis edilen bitki örnekleri Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Herbaryumunda (DUF) saklanmaktadır.

3. 1. 1. Kullanılan Bitki Türü, Tanımı, Yayılışı ve Kullanım Alanları

Cyclotrichium cinsi Türkiye'de 2'si endemik 6 tür ile temsil edilir. Bu türler *Cyclotrichium niveum*, *Cyclotrichium origanifolium*, *Cyclotrichium leucotrichum*, *Cyclotrichium stamineum*, *Cyclotrichium glabrescens* ve *Cyclotrichium longiflorum*'dur. *C.niveum* ve *C. glabrescen* Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yetişen endemik türlerdir.



Resim 3. 1. *Cyclotrichium niveum*

C.niveum bitkisi çok yıllık, küçük çalimsı, 20-50 cm boyunda, çok yoğun beyaz yünsü tüylüdür. Orta yaprakları 8-14 mm uzunluğunda, 6-9 mm eninde olup

yumurtamsı-eliptik şekillidir. Çiçek durumu (vertisillar) 3-10 çiçeklidir. Korolle (taç yapraklar) gül veya leylak renkli olup 7-9 mm uzunluğundadır. Bitki, Temmuz-Ağustos aylarında çiçeklenir, 1200-1830 metre yükseklikte kayalık yamaçlarda yetişir.

C7, Adıyaman; Kahta Narinciye Köyü -Nemrut Dağı, 15 km, 1450 m kayalık yamaçlardan 12.07.2005 tarihinde toplandı. ASE 2005-351 (DUF)

3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Gallik asit, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), α -tokoferol, folin&ciocalteu's fenol reaktifi, sodyum karbonat (Na_2CO_3) demir-2-klorür (FeCl_2), demir-3-klorür(FeCl_3), etilendiamintetraasetikasit (EDTA), ferrozin, ferrisiyanit [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], trikloroasetikasit (TCA), deoksiriboz, 2-tiyobarbitürik asit (TBA), NaOH, askorbik asit, agaroz, Sigma, Aldrich ve Merck'den ticari olarak temin edildi.

3. 1. 3. Kullanılan Aletler

UV Spektrofotometresi (Shimadzu, UV/Visible Recording spektrofotometre), Jel görüntüleme sistemi (Bio Rad Gel Doc XR), elektroforez (Bio Rad), güç kaynağı (Wealtec), santrifüj (Centruin 8000 Series), vorteks (Heidolph), sterilizatör (Heraeus), otoklav (Hirayama), çalkalayıcı (Memmert), terazi (Mettler Toledo), pH metre (Mettler Toledo), evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), membran filtresi (Schleicher&Schuell), blender, derin dondurucu (Sanyo), mikrodalga fırın ve buzdolabı (Arçelik) kullanıldı.

3. 2. METOT

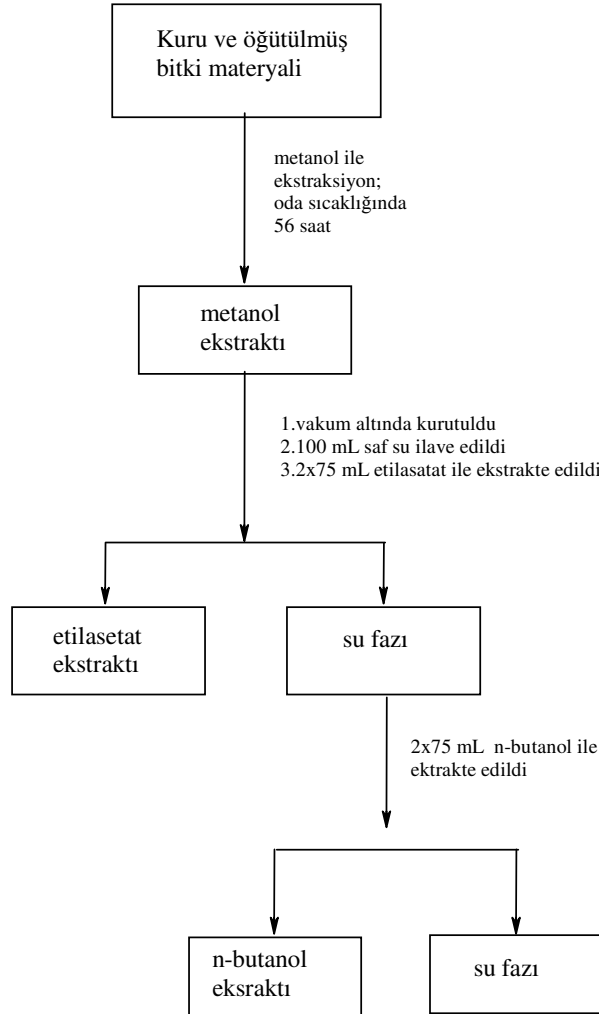
3. 2. 1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki tüm kısımlarıyla (dal+yaprak+çiçek) alınıp blender yardımıyla iyice toz haline getirilerek öğütüldü. Öğütülmüş bitkiden 20 g alınıp 250 mL metanol ile 56 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözünmeyen kısımlar filtre edilip

atıldı. Süzütünün çözücüsü evaporatörde uçuruldu. *C.niveum*'dan 8 g koyu yeşil renkli metanol ekstraktı elde edildi.

Metanol ekstraktından 2 g saklandıktan sonra geriye kalan kısmı 100 mL saf suda 3 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra bu su fazı 2x75 mL etilasetat ile ekstrakte edildi. Etilasetat fazı ayrılıp çözücüsü uçuruldu. İşlem sonunda yaklaşık olarak 1.5 g yeşil renkli etilasetat ekstraktı elde edildi.

Geriye kalan su fazı 2x75 mL n-butanol ile ekstrakte edildi. n-butanol fazı ayrılıp çözücüsü uçuruldu. İşlem sonunda yaklaşık olarak 1.5 g bordo renkli n-butanol ekstraktı elde edildi.



Şekil 3. 1. Bitki ekstraktlarının hazırlanmasının şematik gösterimi

3. 2. 2. Bitki Stoklarının Hazırlanması

Cyclotrivhium niveum bitkisinin tüm ekstraktları için ayrı ayrı stok çözeltiler hazırlandı. Stok metanol ekstraktı çözeltisi, bitkinin metanol ekstraktının metanol çözücüsü içindeki derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Stok etilasetat ekstrakt çözeltisi, bitkinin etilasetat ekstraktının etilasetat çözücüsü içindeki derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Stok n-butanol ekstrakt çözeltisi, bitkinin n-butanol ekstraktının n-butanol çözücüsü içindeki derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan tüm stok çözeltiler kullanılmadan önce 0,2 µm-por çapına sahip membran filtresi ile filtre edildi.

3. 2. 3. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Fenolik bileşenler antioksidant aktivite gösteren moleküllerdir. BHT, quercetin, α-tokoferol ve gallik asit önemli fenolik bileşenlerdir. Ekstraktlar içindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre tayin edildi.⁸⁸ Standart olarak gallik asit kullanıldı. Bu yöntemin dayandığı temel prensip gallik asit içindeki fenolik bileşen miktarını gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktları içindeki toplam fenolik bileşen miktarını gallik asite eşdeğer olarak hesaplamaktır.⁸⁹ Gallik asitin 5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı, bu stok çözeltide 50-500 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çalışılan tüm ekstraktların 1 mg/mL konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. Daha sonra hazırlanan gallik asit ve ekstrakt çözeltilerinden 40 µL alınıp, üzerlerine 1160 µL saf su ve 200 µL folin&ciocalteu's fenol reaktifi (2.0 N) ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve üzerlerine 600 µL % 20'lik sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda karıştırıldı. Daha sonra 765 nm'de UV cihazında absorbens değerleri okundu. Kör olarak gallik asit ve ekstrakt dışındaki tüm maddeler kullanıldı.

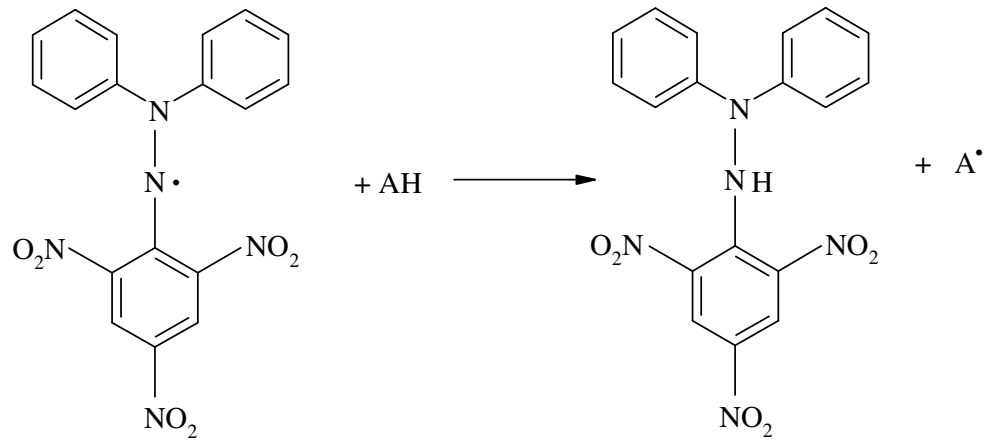
Gallik asitin artan konsantrasyonları karşı absorbens değerleri gafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0,0012 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

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

3. 2. 4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Antioksidant maddelerin DPPH radikalini söndürme etkileri, kendi hidrojenlerini radikale verebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. DPPH serbest ve kararlı bir radikaldir, 1 elektron veya hidrojen alarak kararlı diamagnetik bir moleküle dönüşür. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkanı sağladığından daha yaygın olarak kullanılmaktadır.⁹⁰ Bu metot absorbansın azalması temeline dayanır. DPPH üzerindeki ortaklanmamış elektron görünür bölgede 517 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki reaksiyon DPPH’in ortamdaki derişiminin azalmasına yani absorbansın düşmesine neden olur. Sonuçta oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H ‘dır (şekil 3.2.). Bu olay reaksiyon karışımının renginin mordan sarıya dönmesiyle gözlenir.



Şekil 3. 2. DPPH radikalinin indirgenmesi

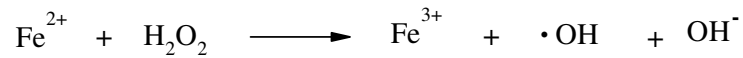
Bitki ekstraktlarının 1 mg/mL’lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 5-500 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. % 96’lık etanol içinde 0.1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı. Seyreltilen bitki ekstraktlarından 3 mL alınarak üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi ve daha sonra 517 nm’de UV cihazında absorbans değerleri ölçüldü. Bu yöntemde pozitif kontrol olarak antioksidant aktivite gösterdiği bilinen bütillenmiş hidroksitoluen ve α-tokoferol kullanıldı. Negatif kontrol olarak 1mL 0.1 mM DPPH ve %96’lık etanol karışımı kullanıldı. Kör olarak da 4 mL %96’lık etanol kullanıldı.

Sonuç olarak artan ekstrakt derişimine karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.⁹¹

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

3. 2. 5. Metal Şelatlama Aktivitesi

Bu metotta bitki ekstraktlarının Fe^{2+} ’yi şelatlama kapasitesine bakıldı. Fenton reaksiyonu sonucu Fe^{2+} , Fe^{3+} ’e dönüşür ve hidroksi radikalleri oluşur. Ortamda Fe^{2+} bulunmazsa bu reaksiyon gerçekleşmez. Bu yüzden Fe^{2+} ’nin şelatlanması hidroksi radikallerinin oluşumunu engellemek açısından çok önemlidir.



Bitki ekstraktlarının 1 mg/mL’lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 50-500 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Hazırlanan çözeltilerden 1 mL alınıp üzerlerine sırasıyla 2 mM 50 µL FeCl₂ çözeltisi ve 5 mM 200 µL ferrozin çözeltisi ilave edildi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra 562 nm’de UV cihazında absorbans değerleri ölçüldü.⁹⁰ Pozitif kontrol olarak güçlü metal şelatlama kapasitesi olan EDTA kullanıldı. Negatif kontrol olarak FeCl₂ ve ferrozin, kör olarak ise alkol ve su karışımı kullanıldı.

Artan ekstrakt konsantrasyonuna karşılık % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.⁹¹

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

3. 2. 6. İndirgeme Gücü

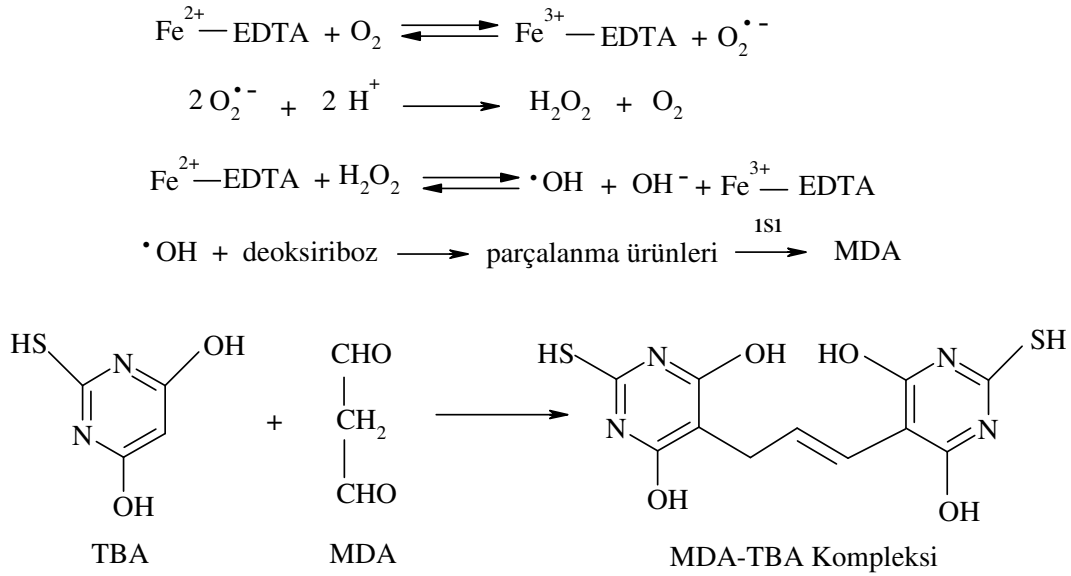
Fenton reaksiyonunda Fe²⁺, H₂O₂ ile reaksiyona girerek, biyomoleküler üzerinde çok zararlı bir radikal olan hidroksi radikalini oluşturur. Fe²⁺, Fe³⁺e yükseltgenir. Birçok indirgen tarafından demirin yükseltgenmiş formu (Fe³⁺), indirgenmiş formuna (Fe²⁺) dönüşür ve bu olay hidroksi radikallerinin oluşumunun artmasına neden olur.⁹²

Bu metotta bitki ekstraktlarının Fe³⁺’ü Fe²⁺’ye indirgeme gücüne bakıldı. Bitki ekstraktlarının 1 mg/mL’lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 50-250 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Hazırlanan çözeltilerden 1 mL alınıp üzerlerine 2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6 fosfat tamponu ve 2.5 mL, %1’lik potasyum ferrisiyanit [K₃Fe(CN)₆] ilave edildi ve reaksiyon karışımı 50 °C su banyosunda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışıma 2.5 mL,

%10'luk TCA eklendi ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Üst tabaka çözeltisinden 2.5 mL alınıp üzerine 0.5 mL, % 0.1'lik FeCl₃ çözeltisi ilave edildi ve karışım 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 700 nm'de UV spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT ve α-tokoferol kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücü gösterir.^{90,93}

3. 2. 7. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının deoksiriboz metodu ile Fe²⁺/askorbat/EDTA/H₂O₂ sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Bu yöntem bazı eşitliklere dayanır (şekil 3.3.). Hidroksi radikali deoksiriboza saldırır, bir dizi reaksiyon sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Oluşan MDA, TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli ve 532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini meydana getirir.^{93,94}



Şekil 3. 3. Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu.

Bitki ekstraktlarının 1 mg/mL’lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 10-100 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Reaksiyon karışımı sırasıyla 100 µL 1 mM EDTA, 10 µL 10 mM FeCl₃, 100 µL 50 mM H₂O₂ , 360 µL 10 mM deoksiriboz, 1 mL ekstrakt (10-100 µg/mL), 330 µL 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu ve 100 µL 1 mM askorbik asit içermektedir. Karışım 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 1 mL alınıp üzerine 1 mL % 10’luk TCA ve 1 mL % 0.5’lik TBA (0.025 M NaOH içinde % 0.025 BHA içerecek şekilde hazırlandı) ilave edildi. Daha sonra 100°C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışım buzda soğutulduktan sonra 532 nm’de UV spektroskopide absorbansı ölçüldü.⁹⁵ Pozitif kontrol olarak radikal söndürme özelliği olduğu bilinen DMSO kullanıldı. Negatif kontrol, sadece ekstrakt ve pozitif kontrol içermeyen test örneğidir.

Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.⁹⁶

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

3. 2. 8. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine Wistar Albino dişi (♀) sıçan beyini üzerinde bakıldı.

3. 2. 8. 1. Beyin Homojenatının Hazırlanması

150 g ağırlığındaki Wistar Albino dişi (♀) sıçanın beyini önce iyice ezildi sonra 120 mM KCl içeren 50 mM, pH 7.4 fosfat tamponu içinde sonikatörde homojenize edildi. Daha sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant -20 °C’de saklandı.⁹⁷

Hazırlanan beyin homojenatından (süpernatant) 100 µL alındı üzerine sırasıyla 200 µL bitki ekstraktı (0.25-2 mg/mL), 100 µL 10 µM FeCl₃ , ve 0.1 mM askorbik asit ilave edildi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışım üzerine 500 µL %28’lik TCA ve 380 µL TBA (0.025 M NaOH içinde % 0.025 BHA içerecek şekilde hazırlandı) ilave edildi ve 100 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde soğutulduktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Son olarak 532 nm’de UV spektrofotometresinde absorbans ölçüldü.⁹⁸ Pozitif kontrol olarak α-tokoferol kullanıldı. Negatif kontrol, sadece bitki ekstraktı ve pozitif kontrol içermeyen test örneğidir.

Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

3. 2. 9. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroferez tekniği de bu prensibe dayanır. Nükleik

asit parçalarının tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanabilmesi, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle genetik mühendisliği teknikleri ile DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden agaroz jel elektroforezi tekniği, moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır.

Agaroz jelde örnekler yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir. DNA şeker fosfat omurgasından dolayı negatif yüklüdür ve bir elektriksel alana konulduğu zaman bu negatif yükünden dolayı katottan anoda doğru hareket eder.

pBluescript M13+ plazmid DNA'nın H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikali ile etkileşmesi Agaroz Jel Elektroforezi ile incelendi. Bitki ekstraktlarının 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında DNA'yı OH radikaline karşı koruma etkisine bakıldı. Pozitif kontrol olarak OH radikali söndürücü etkileri olduğu bilinen DMSO, tiyoüre ve potasyum iyodür kullanıldı.

Bitki ekstraktlarının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkileri % inhibisyon olarak verildi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.¹⁰⁰

$$\% I = 1 - [(S_{k+m} - S_c) / (S_k - S_c)]$$

S_{k+m} = DNA'nın kesimi önleyen madde ile etkileştirilmesinden sonra geriye kalan supercoiled formun yüzdesi

S_c = Kontrol DNA'nın supercoiled formunun yüzdesi

S_k = DNA'nın kesimi önleyen madde dışındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formun yüzdesi

3. 2. 9. 1. Agaroze Jel'in Hazırlanması

Agaroz (1 g) 100 mL Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) ilave edildi 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 sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletildi.

3. 2. 9. 2. Agaroze Jel Elektroföze Yapılması

Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel 200 mL Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroföze tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroföze 40 V'ta 500 mA akım uygulanarak 180 dakika süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildi, tel bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı çekildi. Fotoğraf BIO RAD GEL DOC XR görüntüleme sistemi ile çekildi.

3. 2. 9. 3. Plazmid DNA Saflaştırma

DNA kesiminin incelemenin bir yolu supercoiled DNA'nın (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I);. open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) veya linear (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III) forma dönüşümünü incelemektir. Agaroze Jel Elektrofözinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir. Çalışmada kullanılan pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2 kb) Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı.¹⁰⁰ pBluescript M13+ plazmid DNA' nın saflığına, hem elektroföze hem de UV spektroskopisinde 260/280

nm absorbanslarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorbans ölçümü ile hesaplandı. (50 µg/mL için $A_{260}=1.0$)

3 .2. 10. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS for 12.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

4. BULGULAR

4. 1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Bitkinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Standart olarak kullanılan gallik asitin 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi. (Şekil 4.1.)

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0012 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktlarının 1 mg'larının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarları gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı.

Cyclotrichium niveum'un metanol ekstraktının 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 200.9 ± 35.0 µg gallik asite, etilasetat ekstraktının 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 192.4 ± 42.0 µg gallik aside ve n-butanol ekstraktının 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı ise 252.0 ± 42.0 µg gallik asite eşdeğer olduğu bulundu. (Tablo 4.1.)

4. 2. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının DPPH radikalini söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Tablo 4.2.)

DPPH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 5-500 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *C.niveum*'un metanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesi % 8.6 ± 3.9 – 90.3 ± 1.2 arasında (şekil 4.2.), etilasetat ekstraktının % 8.6 ± 3.9 – 91.4 ± 0.7 arasında (şekil 4.3.), n-butanol ekstraktının % 7.2 ± 0.6 – 91.7 ± 0.7 arasında (şekil 4.4.) ve pozitif kontrol olarak kullanılan α-tokoferolün % 5.8 ± 0.8 – 90.3 ± 4.0 arasında, BHT'nin % 7.5 ± 0.7 – 96.6 ± 0.5 arasında bulundu.

4. 3. Metal Şelatlama Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Tablo 4.3.)

Metal şelatlama aktivitesi incelenirken 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *C.niveum*'un metanol ekstraktının metal şelatlama aktivitesi % 12.3±1.6 – 12.4±0.8 arasında (şekil 4.5.), etilasetat ekstraktının % 12.2±1.5 – 14.9±0.9 arasında (şekil 4.6.), n-butanol ekstraktının % 12.4±1.7 – 11.9±2.1 arasında (şekil 4.6.) ve pozitif kontrol olarak kullanılan EDTA'nın % 95.5±4.1 – 99.8±0.0 arasında ve BHT'nin % 15.1±0.3 – 16.7±1.0 arasında bulundu.

4. 4. İndirgeme Gücü

Bitki ekstraktlarının Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme gücüne bakıldı. İndirgeme gücü konsantrasyona karşı absorbans olarak verildi. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücü gösterir.

Bitki ekstraktlarının indirgeme gücüne bakılırken 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *C.niveum*'un metanol ekstraktının absorbans değeri 0.090±0.003 – 0.260±0.005 arasında (şekil 4.8), etilasetat ekstraktının absorbans değeri 0.100±0.009 – 0.270±0.020 arasında (şekil 4.9.), n-butanol ekstraktının absorbans değeri 0.140±0.013 – 0.420±0.020 arasında (şekil 4.10.), pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'nin absorbans değeri 0.300±0.014 – 0.640±0.050 arasında ve α-tokoferolün absorbans değeri 0.110±0.008 – 0.410±0.011 arasında bulundu. Negatif kontrolün (sadece ekstrakt ve pozitif kontrol içermeyen reaksiyon karışımı) absorbans değeri ise 0.032 olarak bulundu.

4. 5. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Tablo 4.4.)

Bitkinin ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *C.niveum*'un metanol ekstraktının OH radikalini söndürme aktivitesi % 71.4±3.8 – 82.3±1.6 arasında (şekil 4.2.), etilasetat ekstraktının % 62.4±2.4 – 74.4±1.3 arasında (şekil 4.3.), n-butanol ekstraktının % 63.5±1.1 – 79.9±1.9 arasında (şekil 4.4.) ve pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO'nun % 67.2±8.6 – 79.5±3.0 arasında bulundu.

4. 6. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Tablo 4.5.)

Bitkinin ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelenirken 0.25-2 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *C.niveum*'un metanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi % 80.4±1.0 – 82.7±0.7 arasında, etilasetat ekstraktının % 77.3±1.5 – 85.8±1.3 arasında, n-butanol ekstraktının % 85.3±1.4 – 89.9±0.5 arasında ve pozitif kontrol olarak kullanılan α - tokoferolün % 67.2±8.6 – 79.5±3.0 arasında bulundu. (şekil 4.14.)

4. 7. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

pBluescript M13+ plazmid DNA'nın H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikali ile etkileşmesi Agaroz Jel Elektroforezi ile incelendi. Bitki ekstraktlarının DNA'yı OH radikaline karşı koruma etkisine bakıldı. Bitki ekstraktları 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlandı. Pozitif kontrol olarak OH radikali söndürücü olarak bilinen DMSO, tiyoüre ve potasyum iyodür kullanıldı.

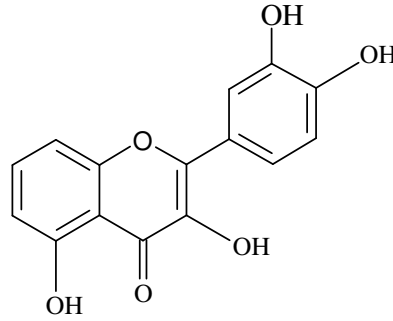
C.niveum'un metanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisi 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında % 55.28 – 83.94 olarak bulundu (şekil 4.15.). Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO'nun 50 mM konsantrasyonda %51.67, tiyoürenin 10 mM konsantrasyonda %78.97 ve potasyum iyodürün (KI) %78.50 aktivite gösterdiği tespit edildi. (şekil 4.19.)

C.niveum'un etilasetat ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisi 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında % 49.28 – 97.86 olarak bulundu (şekil 4.15.). Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO'nun 50 mM konsantrasyonda %46.77, tiyoürenin 10 mM konsantrasyonda %79.74 ve potasyum iyodürün (KI) %77.09 aktivite gösterdiği tespit edildi. (şekil 4.19.)

C.niveum'un n-butanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisi 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında % 18 – 93.48 olarak bulundu (şekil 4.15.). Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO'nun 50 mM konsantrasyonda %45.43, tiyoürenin 10 mM konsantrasyonda %76.75 ve potasyum iyodürün (KI) %76.26 aktivite gösterdiği tespit edildi. (şekil 4.19.)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) hücre membranında, proteinlerde, yağlarda ve DNA’da oksidatif hasara neden olarak erken yaşlanma, kanser, damar sertleşmesi ve katarakt gibi dejeneratif hastalıklara yol açarlar. Antioksidantlar veya radikal söndürücü maddelerle bu oksidatif hasarın inhibe ederek, bu tür hastalıkların riskini azaltır. Fenolik maddeler doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Flavonoidlerin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, radikal söndürücü özelliğinin olduğu metal iyonlarını şelatladığı ve lipooksigenazı inaktive ettiği rapor edilmiştir.¹⁰¹



Flavonoid

Fenolik bileşenler, güçlü radikal zincir kırıcı antioksidantlar olarak bilinirler.¹⁰² Fenoller içerdikleri hidroksi gruplarından dolayı radikal söndürücü özellikleri olan çok önemli bitki bileşenleridir.¹⁰³ Kanserojenler ve mutajenler üzerinde inhibe edici özellikleri olduğundan antioksidatif aktivitede direkt rol alırlar.¹⁰⁴ *C. niveum* bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Metanol ekstraktının 1 mg’nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 200.9 µg gallik asite, etilasetat ekstraktının 1 mg’nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 192.4 µg gallik asite ve n-butanol ekstraktının 1 mg’nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı ise 252.0 µg gallik asite eşdeğer olarak bulundu. (Tablo 4.1.). Polifenollerin antioksidant aktiviteden sorumlu olduğu bilinmektedir. n-

butanol ekstaraktında bulunan toplam fenolik bileşen miktarının fazla olması, bu ekstraktın yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Tepe ve ark., *C. origanifolium* bitkisi ile yaptığı antioksidant aktivite çalışmasında bu bitkinin diklorometan ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarının 105.6 µg/mL galik asite eşdeğer olduğunu tespit etmişler.⁸⁷

Antioksidant maddelerin DPPH radikalini söndürme etkileri, kendi hidrojenlerini radikale verebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. DPPH serbest kararlı bir radikaldir, 1 elektron veya hidrojen alarak kararlı diamagnetik bir moleküle dönüşür. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkanı sağladığından daha yaygın kullanılmaktadır.^{90,104}

DPPH radikalini söndürme aktivitesinde 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Tüm ekstraktlar maksimum aktiviteye 250 µg/mL konsantrasyonda ulaştı bu noktadan sonra konsantrasyona bağlı olarak bir artış gözlenmedi. Bu konsantrasyonda (250 µg/mL) *C.niveum*'un metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının DPPH radikalini söndürme aktiviteleri sırasıyla % 90.0, 91.0, 91.0 olarak bulundu. Tepe ve ark., *C. origanifolium* bitkisinin esansiyel yağının (17.1 µg/mL) DPPH radikalini söndürme aktivitesini % 50 olarak bulmuşlar.⁸⁷ *C.niveum*'un n-butanol ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarı metanol ve etilasetat ekstraktlarından daha fazla bulundu ancak her üç ekstraktın da aynı derecede DPPH radikalini söndürme aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Bitki ekstraktlarının serbest radikalleri tutması, bu ekstraktların içinde bulunan maddelerin serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürdüğünü göstermektedir. Ekstraktların DPPH radikalini söndürme aktivitelerini pozitif kontrollerle kıyaslırsak, α-tokoferol (% 89.0) ile aynı ölçüde, BHT'den (%96.0) ise az bir miktarda daha düşük aktivite gösterdiler. (Tablo 4.2.)

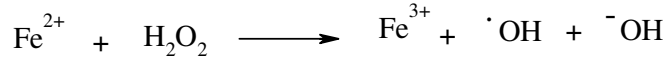
Metal şelatlama kapasitesi, lipid peroksidasyonunda metal katalizli geçişi azalttığından ve hidroksi radikallerinin oluşumunu engellediğinden önemli bir antioksidant özelliktir. Şelatlayıcı maddeler, metal iyonlarıyla σ bağı yapar ve metal iyonunun okside formunun redoks potansiyelini azalttığından etkili sekonder antioksidant olarak davranırlar.¹⁰⁵

Ferrozin, Fe²⁺ ile kompleks oluşturur. Ortamda başka bir şelatlayıcı madde olduğunda bu kompleks bozulur. Şelatlayıcı madde ferrozin ile yarışmalı olarak Fe²⁺ yi

ferrozinden önce tutmaya çalışır.¹⁰⁶ Bitki ekstraktlarının metal bağlama kapasiteleri pozitif kontrol olarak kullanılan güçlü şelatlayıcı EDTA ile kıyaslandığında daha düşük bulundu.

C.niveum'un metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi 500 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 12.4, 14.9 ve 11.9 olarak ve pozitif kontrol olarak kullanılan EDTA'nın ise % 99.8 olarak bulundu. Tüm ekstraktlar aynı derecede aktivite gösterdiler aralarında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bu sonuçlar, ferrozinin Fe²⁺'yi *C.niveum*'nın ekstraktlarından önce tuttuğunu, ve ekstraktların bu kompleksi bozmada yetersiz kaldığını ve konsantrasyon arttıkça bu sonucun değişmediğini göstermektedir.

Fenton reaksiyonunda Fe²⁺, H₂O₂ ile reaksiyona girerek, biyomoleküler üzerinde çok zararlı bir radikal olan hidroksi radikalini oluşturur.¹⁰⁷ Fe²⁺, Fe³⁺'e yükseltgenir. Birçok indirgen tarafından demirin yükseltgenmiş formu (Fe³⁺) indirgenmiş formuna (Fe²⁺) dönüşür ve bu olay hidroksi radikallerinin oluşumunun artmasına neden olur.⁹²

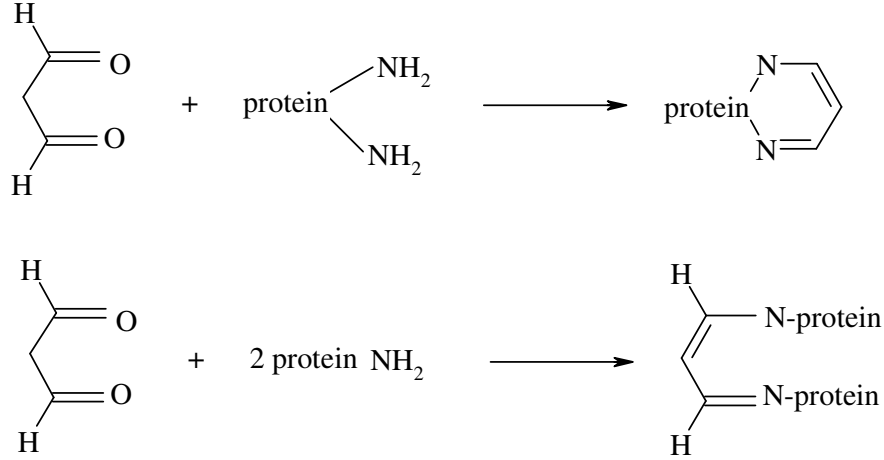


Bitki ekstraktlarının indirgeme özellikleri BHT ve α-tokoferol ile kıyaslandı. Bitkinin metanol (şekil 4.8.), etil asetat (şekil 4.9.), ve n-butanol (şekil 4.10.) ekstraktlarının indirgeme potansiyelleri konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdi. İndirgeme güçleri BHT > α-tokoferol > n-butanol > etilasetat > metanol olarak bulundu.

Bitkinin hidroksi radikalini söndürme aktivitesi spektrofotometrik ve elektroforetik olarak iki yöntemle incelendi. Spektrofotometrik olarak deoksiriboz testi uygulandı. Elektroforetik olarak ise DNA Agoraz Jel Elektroforezi yapıldı.

Deoksiriboz metodu ile bitki ekstraktlarının Fe²⁺/askorbat/EDTA/H₂O₂ sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Hidroksi radikali deoksiriboza saldırır, bir dizi reaksiyon sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Oluşan MDA ,TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli ve 532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini meydana getirir.^{93,94} (şekil 3.3.) Ortama radikal söndürücü bir madde ilave edildiği zaman bu radikal deoksiriboz ile yarışmalı olarak hidroksi radikali ile etkileşir ve MDA oluşumunu azaltır.

MDA; membrandaki iyon alışverişi sırasında görev yapan Na^+K^+ -ATPaz enzimini inaktive edebilir, proteinlerin amin grupları ile Schiff bazı oluşturarak ya da tiyol grupları ile etkileşerek proteinlerin çapraz bağlanmasına neden olabilir (şekil 5.1.) DNA bazları ile etkileşerek DNA-DNA zincirinde çapraz bağlanma veya DNA-protein çapraz bağlanma yapabilir (şekil 1.10.)



Şekil 5. 1. MDA ‘nın proteinlerle etkileşmesi

Bitki ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 5-100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. Tüm ekstraktların OH radikalini söndürme aktivitesi gösterdi. OH radikalini söndürme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı olarak ciddi bir artış gözlenmedi. 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda *C.niveum*’un metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktiviteleri sırasıyla % 71.4, 62.4, 63.5, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ise % 74.7, 74.4, 77.9 olarak bulundu. 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda metanol ekstraktı en fazla aktiviteyi gösterirken, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda n-butanol ekstraktı daha fazla aktivite gösterdi. DMSO pozitif kontrol olarak kullanıldı ve aktivitesi %67.2-82.3 arasında bulundu. Tüm ekstraktlar birbirine yakın değerde ve pozitif kontrolle kıyaslanabilecek ölçüde OH radikalini söndürme aktivitesi gösterdiler.

Antioksidantlar lipid peroksidasyonunda farklı şekillerde etkili olurlar; lokalize olmuş oksijen konsantrasyonunu azaltırlar, hidrojen atomu kopararak lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri söndürürler, peroksit oluşumunu önlemek için

singlet oksijeni tutarlar, reaktif türlerin oluşumunu engellemek için oksidasyonu katalizleyen metal iyonlarını tutarlar, yağ asitlerinin yan zincirlerinden fazla hidrojen koparılmasını diye zincir kırarlar.¹⁰⁸

Bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi sıçan beyni homojenatı üzerinde in vitro olarak araştırıldı. Tüm ekstraktlar güçlü lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi gösterdi. Aradaki fark çok olmamakla beraber en fazla aktiviteyi n-butanol ekstraktı gösterdi. 2 mg/mL konsantrasyonda *C.niveum*'un metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktiviteleri sırasıyla % 84.9, 85.8 ve 89.9 olarak bulundu. (Tablo 4.5.) Aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan α - tokoferol % 95.9 aktivite gösterdi. Ekstraktlar ile α - tokoferol arasındaki % inhibisyon farkının az olması ekstraktların etkili birer antioksidant olduklarını gösterir.

Kanser, hem erkeklerde hem kadınlarda yaygın ölüm sebebidir. Bu yüzden daha etkili ve daha az toksik antikanser ilaçların keşfi büyük bir ihtiyaç haline gelmiştir. Bitki kökenli birçok maddenin çeşitli karsinogenezlerde kemoterapik ve antikanser etki gösterdiği bilinmektedir.¹⁰⁹ Polifenolik bileşenlerin gastrointestinal kansere karşı koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir.¹⁰⁹ Polifenoller aynı zamanda serbest radikallerin rol aldığı ateroskleroz, yaşlanma, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etki gösterirler.¹¹⁰

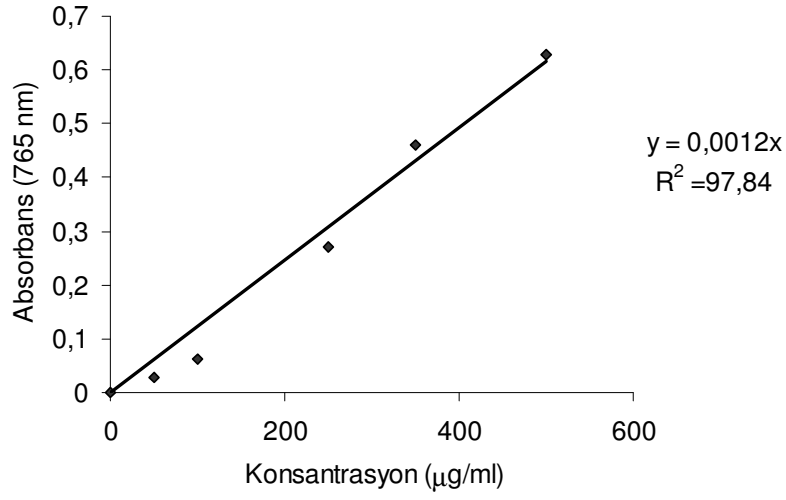
C.niveum bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisi DNA Agaroz Jel Elektroforeziyle incelendi.¹¹¹ Şekil 4.15, şekil 4.16 ve şekil 4.17, DNA'nın H₂O₂ fotolizinden sonra ekstraktlar varlığında (50-500 µg/mL) ve yokluğunda elektroforetik alanda yürüyüşünü göstermektedir. pBluescript M13+plazmid DNA agaroz jelde çift bant gösterdi. (1.kuyucuk). Hızlı yürüyen bant supercoiled DNA ve yavaş yürüyen bant lineer DNA'dır. DNA'nın H₂O₂ varlığında UV ile etkileştirilmesi (3.kuyucuk) ile supercoiled DNA'da kesimi meydana geldi ve supercoiled form, lineer ve opencircular forma dönüştü. Bu H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikalının DNA'yı kestiğini göstermektedir. *C.niveum* ekstraktlarının (kuyucuk 9-14) OH radikalleri sonucu oluşan DNA kesimini engellediği gözlemlendi.

Kontrol DNA'nın supercoiled formunun yüzdesi % 85.12'dir. DNA'nın H₂O₂ fotolizi sonucu supercoiled formun hemen hemen tamamı lineer ve opencircular forma

dönüştüğü tespit edildi. Metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının eklenmesiyle (500 µg/mL) supercoiled formun yüzdesi sırasıyla % 80.78, 84.53 ve 83.81 olarak bulundu. Ekstraktların net kesim önlemleri aynı konsantrasyonda sırasıyla % 83.94, 97.86, 93.48 olarak elde edildi. Sonuçlardan görüldüğü gibi etil asetat ekstraktı neredeyse kesimin tamamını önledi. Ekstraktların aktiviteleri DMSO (50 mM), KI (50 Mm), tiyoüre (10 mM) ile karşılaştırıldı, bu pozitif kontrollerin net kesimi önlemleri sırasıyla % 47.9, 77.3 ve 78.5 olarak bulundu. Bitki ekstraktlarının pozitif kontrollerden daha güçlü, hidroksi radikallerini söndürme aktivitesi gösterdiği belirlendi.

Sonraki çalışmalar *C.niveum* ekstraktlarının antioksidant aktivitesinde sorumlu olan bileşenlerinin yapılarının aydınlatılmasına yönelik olacaktır. *C.niveum* ekstraktlarının nasıl antioksidant aktivite gösterdiğinin daha iyi anlaşılması için her ekstarktın içindeki maddelerin yapılarının aydınlatılıp, bunların tek tek ve farklı kombinasyonlar olarak antioksidant aktivitelerinin incelenip, bitki fenolik bileşen karışımlarının antioksidant aktivitede sinerjik etkilerinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

6. TABLOLAR, ŐEKİLLER VE RESİMLER



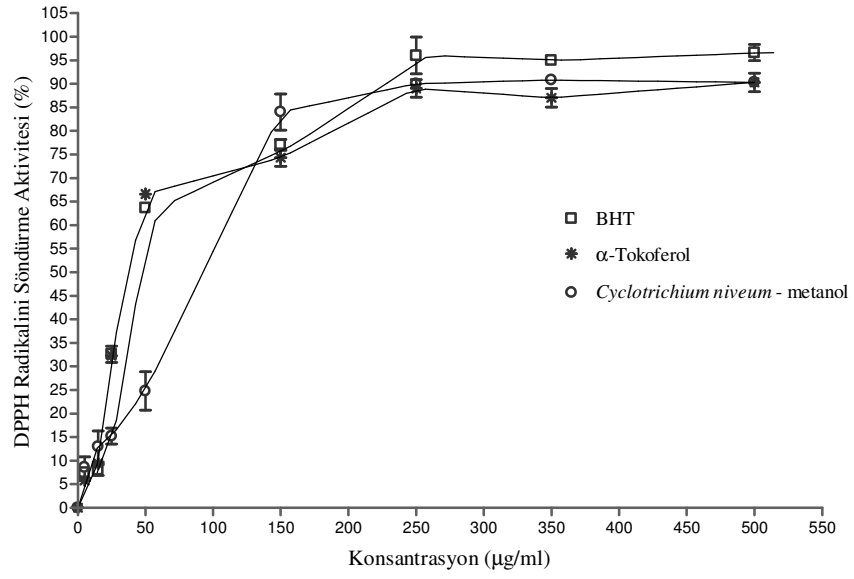
Şekil 4.1. Gallik asitin artan derişimlerine karşılık ölçülen absorbans değerleri.

Ekstraktlar	Gallik asit eşdeğerleri (µg GAE/mg ekstrakt)
<i>Cyclotrichium niveum</i> - metanol	200,9 ± 35,0
<i>Cyclotrichium niveum</i> - etilasetat	192,4 ± 42,0
<i>Cyclotrichium niveum</i> - n-butanol	252,0 ± 42,0

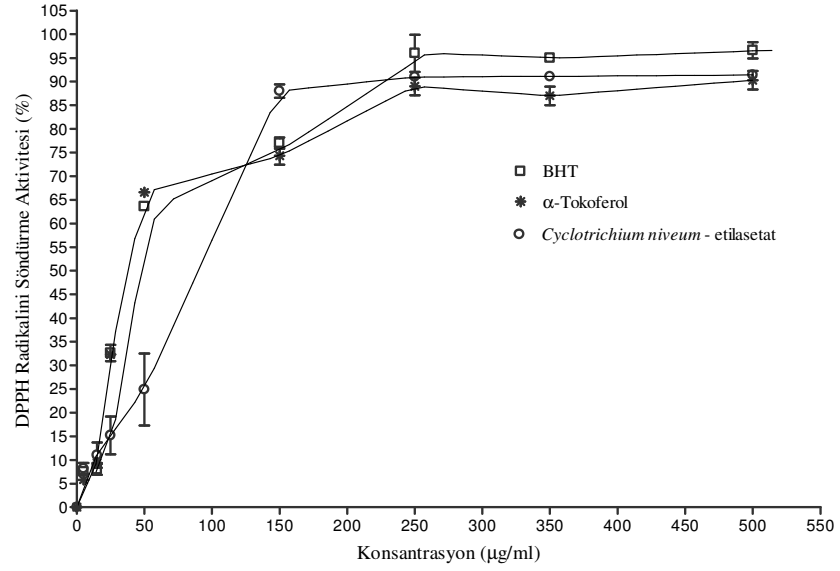
Tablo 4.1. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının içindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

Ekstraktlar	Konsantrasyon aralığı (µg/mL)							
	5	15	25	50	150	250	350	500
Metanol	8,6 ± 3,9	13,0 ± 5,7	15,2 ± 2,9	24,8 ± 7,0	84,0 ± 6,6	90,0 ± 1,2	90,8 ± 0,8	90,3 ± 1,2
Etilasetat	8,6 ± 2,0	11,0 ± 4,6	15,2 ± 6,9	24,9 ± 5,7	88,0 ± 2,4	91,0 ± 1,2	91,1 ± 1,3	91,4 ± 0,7
n-Butanol	7,2 ± 0,6	11,2 ± 2,1	12,6 ± 6,6	46,0 ± 7,0	89,0 ± 3,4	91,0 ± 1,3	91,5 ± 0,7	91,7 ± 0,7
BHT	7,5 ± 0,7	8,0 ± 1,9	32,6 ± 2,8	63,6 ± 0,5	77,0 ± 2,0	96,0 ± 3,6	95,0 ± 1,5	96,6 ± 0,5
α-Tokoferol	5,8 ± 0,8	9,4 ± 0,6	32,3 ± 0,5	66,6 ± 0,5	74,0 ± 3,2	89,0 ± 3,7	87,0 ± 3,4	90,3 ± 4,0

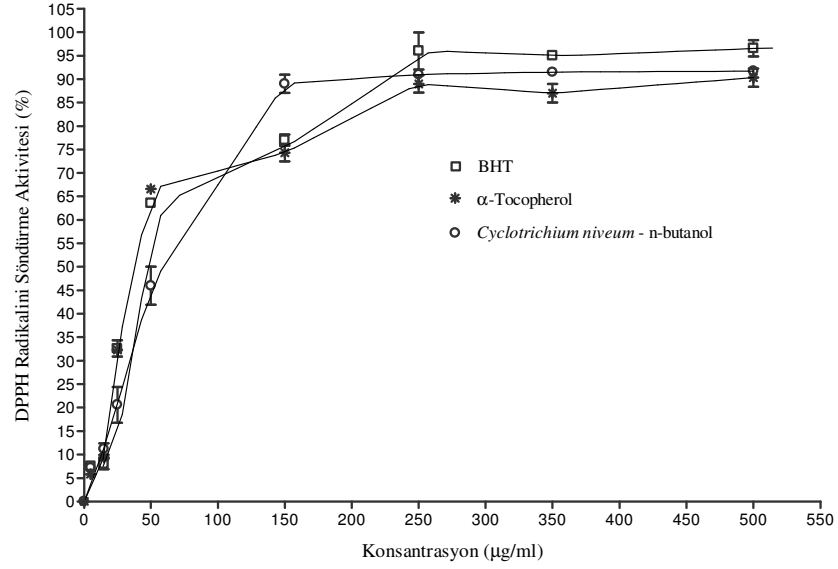
Tablo 4.2. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının, BHT ve α-tokoferol'ün DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



Şekil 4.2. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT ve α -tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



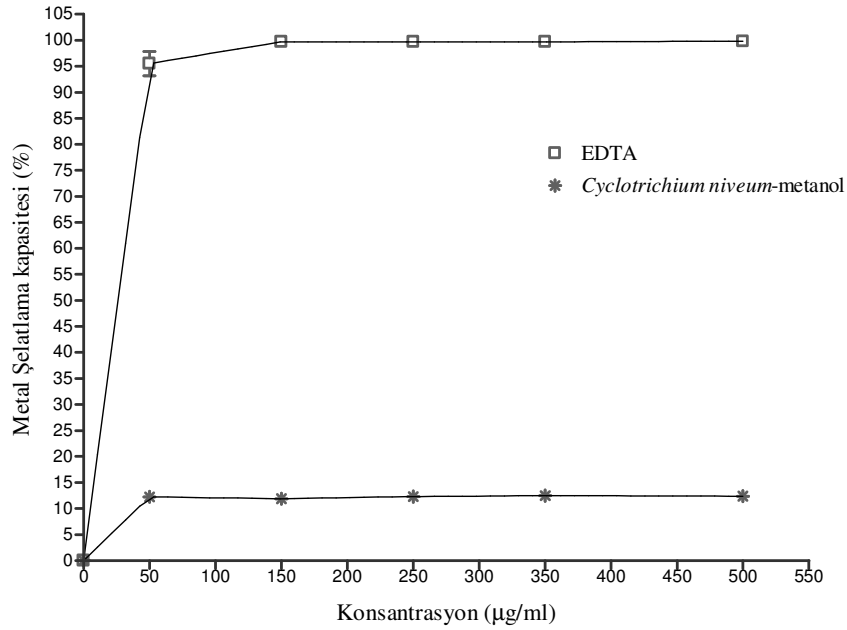
Şekil 4.3 *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT ve α-tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



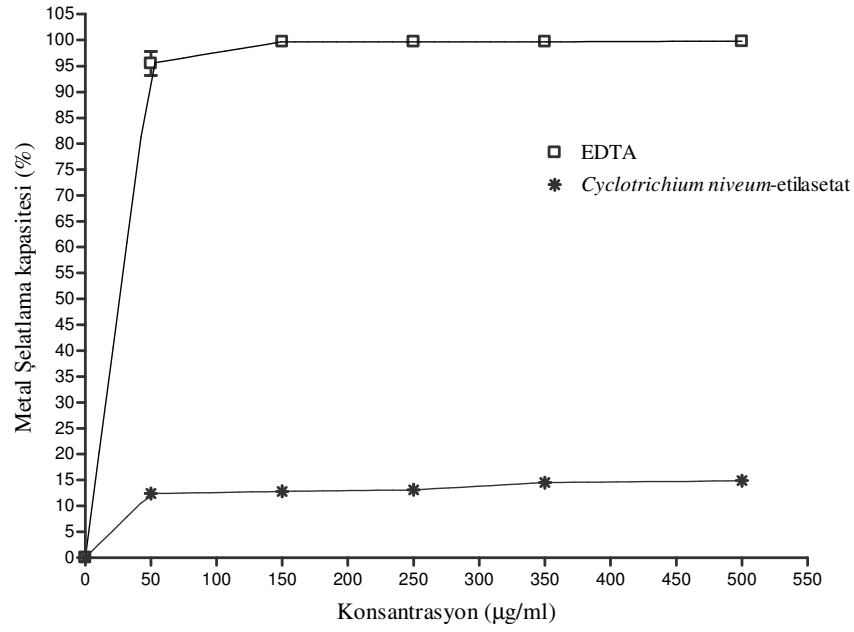
Şekil 4.4 *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT ve α -tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

Ekstraktlar	Konsantrasyon aralığı (µg/mL)				
	50	150	250	350	500
Metanol	12,30 ± 1,60	11,90 ± 1,27	12,30 ± 0,98	12,50 ± 0,90	12,40 ± 0,81
Etilasetat	12,20 ± 1,50	12,80 ± 1,26	13,10 ± 0,88	14,50 ± 1,80	14,90 ± 0,90
n-Butanol	12,40 ± 1,70	13,30 ± 0,65	12,80 ± 1,40	12,20 ± 2,10	11,90 ± 2,10
EDTA	95,50 ± 4,10	99,70 ± 0,17	99,70 ± 0,17	99,70 ± 0,05	99,80 ± 0,00

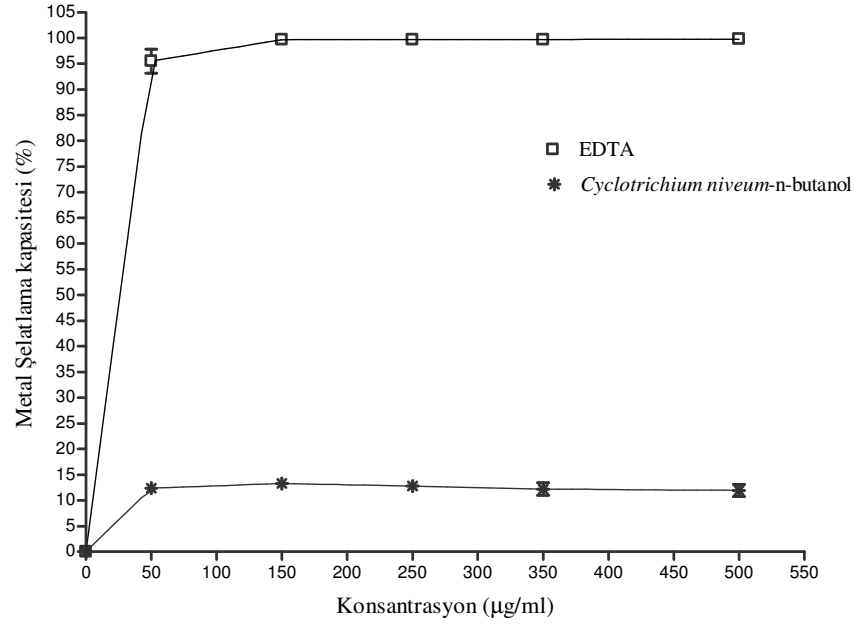
Tablo 4.3. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve EDTA' nın Fe²⁺ iyonunu şelatlama aktivitesinin % değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



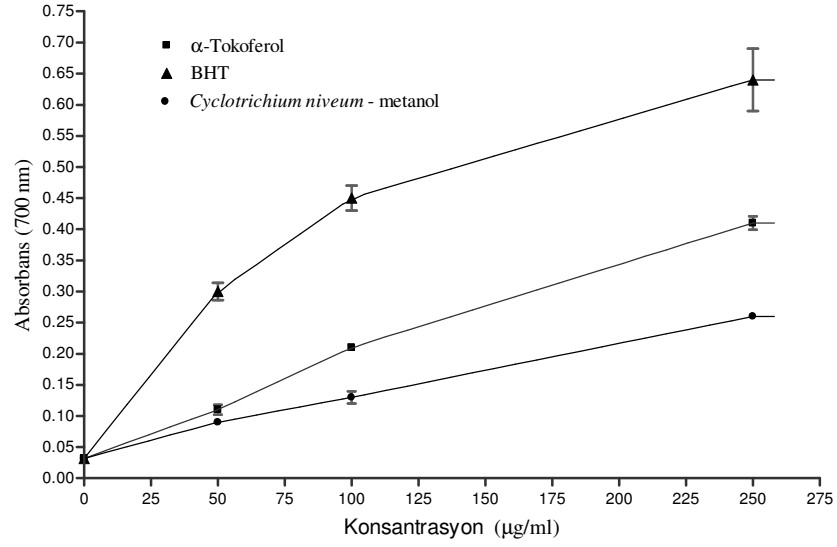
Şekil 4.5. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesi. EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



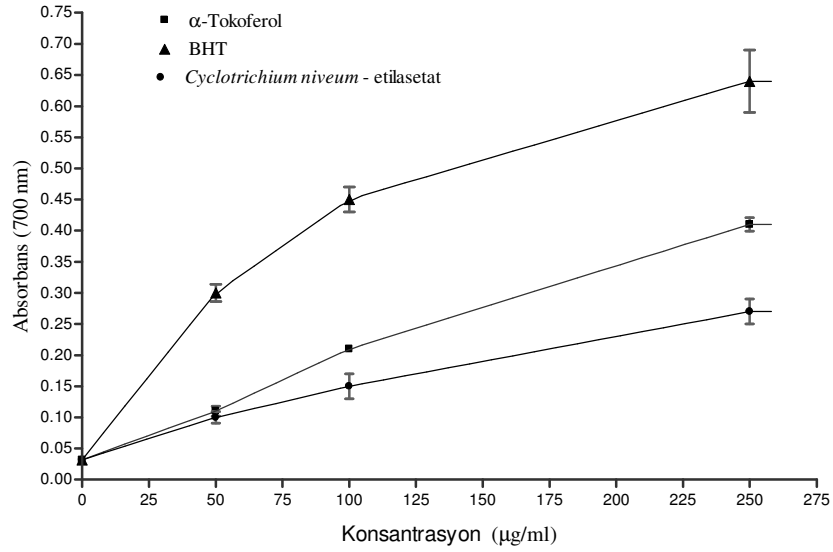
Şekil 4.6. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesi. EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



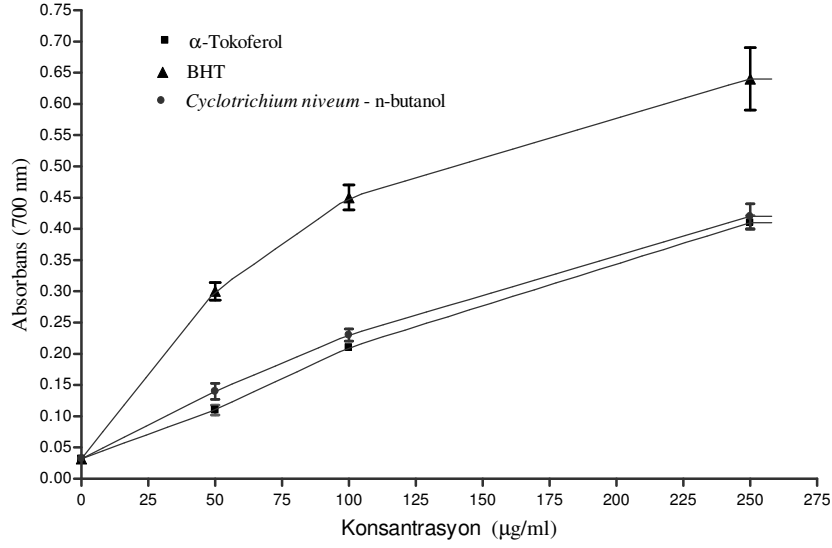
Şekil 4.7. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesi. EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



Şekil 4.8. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT 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 ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



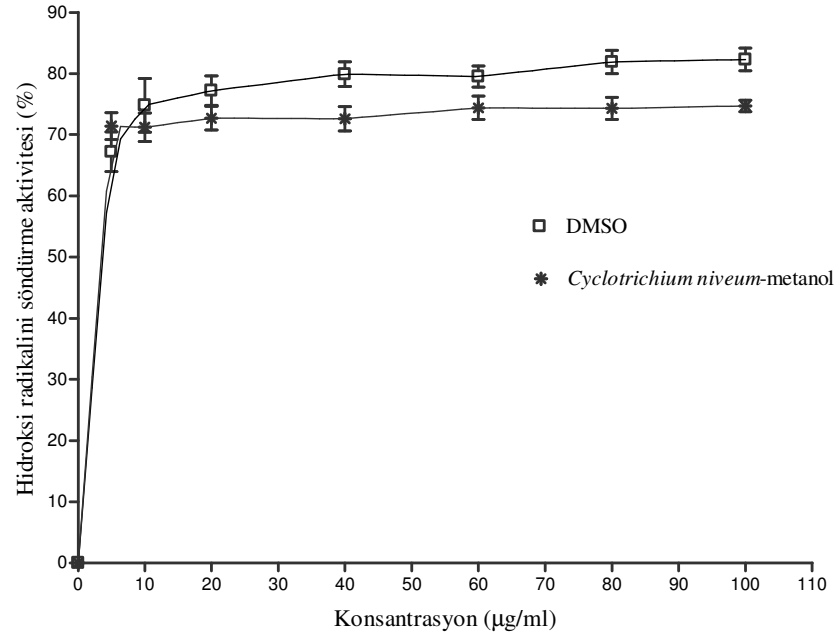
Şekil 4.9. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT ve α- tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



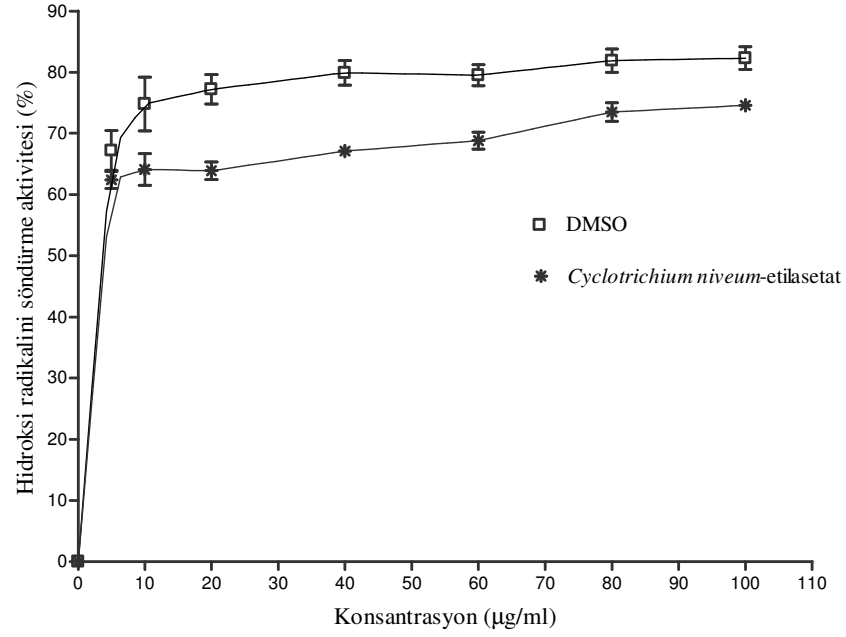
Şekil 4.10. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT ve α- tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

Ekstraktlar	Konsantrasyon aralığı (µg/mL)						
	5	10	20	40	60	80	100
Metanol	71,40 ± 3,80	71,20 ± 7,60	72,70 ± 3,30	72,60 ± 3,40	74,40 ± 3,30	74,30 ± 3,10	74,70 ± 1,60
Etilasetat	62,40 ± 2,40	64,10 ± 4,00	63,90 ± 2,50	74,70 ± 1,40	67,10 ± 2,40	74,60 ± 2,60	74,40 ± 1,30
n-Butanol	63,50 ± 1,10	64,30 ± 4,50	69,10 ± 2,40	68,80 ± 3,40	70,80 ± 5,30	73,50 ± 1,90	77,90 ± 0,97
DMSO	67,20 ± 8,60	74,80 ± 1,40	77,20 ± 4,20	79,50 ± 3,50	79,90 ± 3,00	81,90± 3,30	82,30 ± 3,20

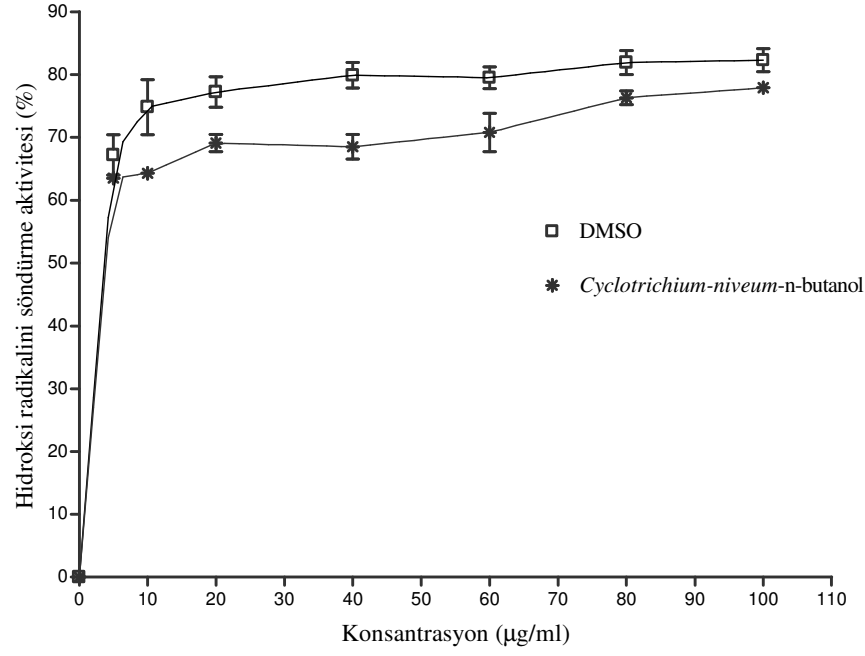
Tablo 4.4. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının ve DMSO'nun farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile OH radikalini söndürme gücü (%). Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



Şekil 4.11. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%). DMSO pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



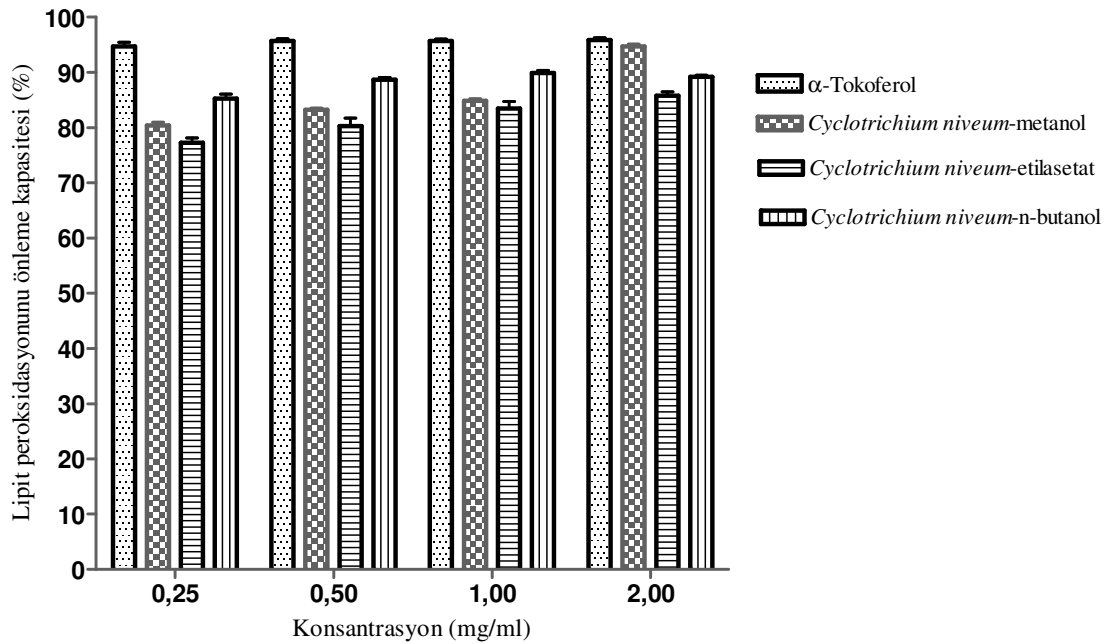
Şekil 4.12. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%). DMSO pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



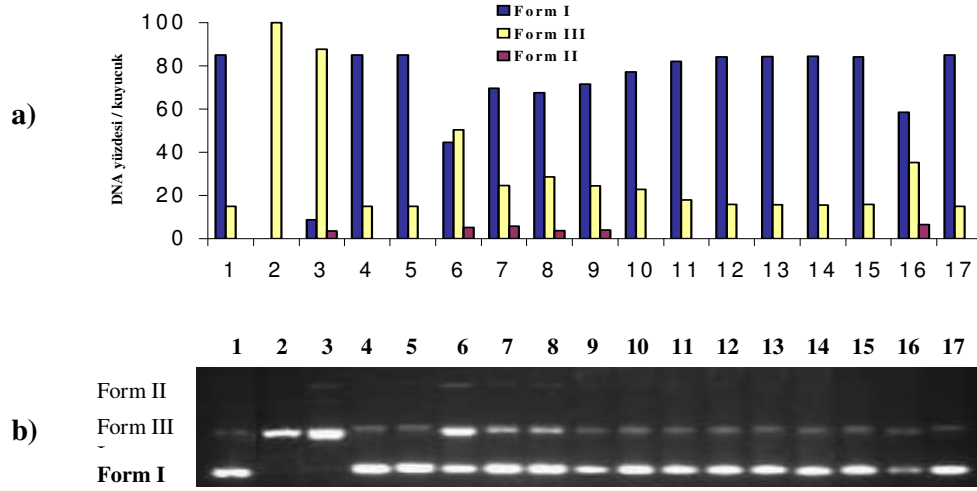
Şekil 4.13. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%). DMSO pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

Ekstraktlar	Konsantrasyon aralığı (mg/mL)			
	0,25	0,5	1	2
Metanol	80,40 ± 1,00	83,20 ± 0,60	83,70 ± 0,50	84,90 ± 0,70
Etilasetat	77,30 ± 1,50	80,30 ± 2,50	83,50 ± 2,20	85,80 ± 1,25
n-Butanol	85,30 ± 1,40	88,70 ± 0,70	89,20 ± 0,80	89,90 ± 0,50
α-Tokoferol	94,70 ± 1,31	95,70 ± 0,70	95,70 ± 0,60	95,90 ± 0,60

Tablo 4.5. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının ve α-tokoferolün lipit peroksidasyonunu önleme aktivitelerinin % değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

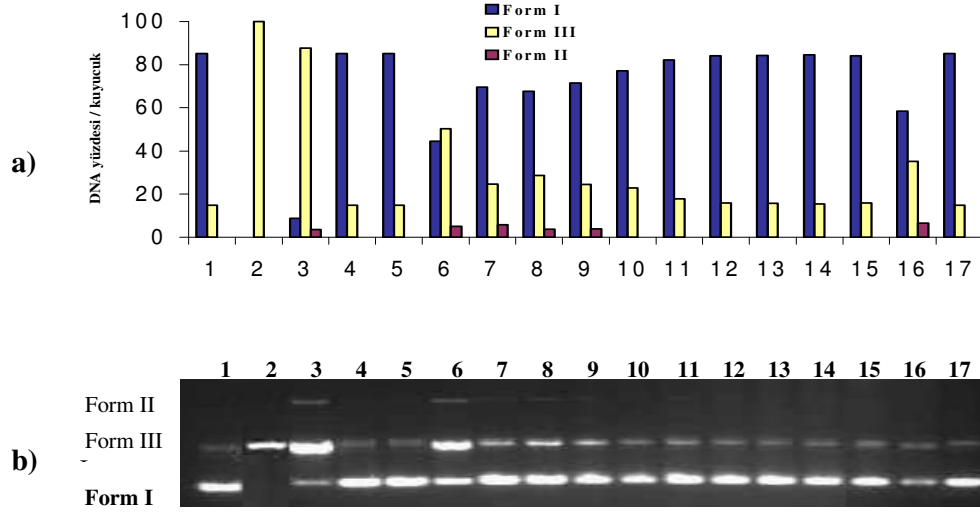


Şekil 4.14 *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktiviteleri. α-Tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)



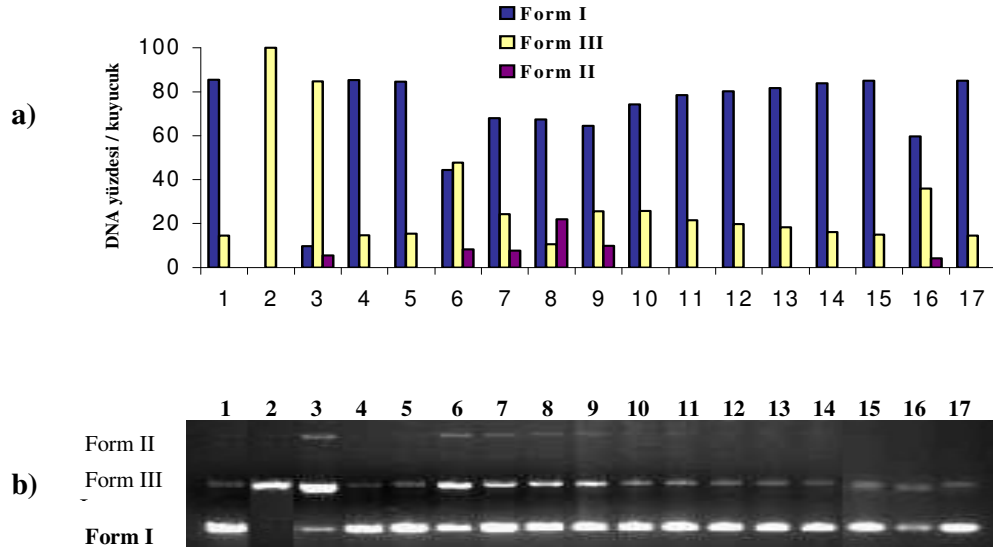
Şekil 4.15. (a) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II ve Form III yüzdeleri. **(b)** *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstraktının ve OH radikalini söndürücü olarak bilinen dimetilsülfoksit (DMSO), tiyoüre, potasyum iyodür (KI)'ün supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan ·OH'ne karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/L H₂O₂ içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 5 dk yapıldı.

1. kuyucuk: DNA; **2. kuyucuk:** Linearized pBluescript M13+DNA (Pst I digest); **3. kuyucuk:** DNA + H₂O₂ + UV; **4. kuyucuk:** DNA + UV; **5. kuyucuk:** DNA + H₂O₂; **6. kuyucuk:** DNA + DMSO(50 mM) + H₂O₂ + UV; **7. kuyucuk:** DNA + tiyoüre(10 mM) + H₂O₂ + UV; **8. kuyucuk:** DNA + KI(50 mM) + H₂O₂ + UV; **9. kuyucuk:** DNA + C_m(50 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **10. kuyucuk:** DNA + C_m(100 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **11. kuyucuk:** DNA + C_m(200 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **12. kuyucuk:** DNA + C_m(300 µg/mL) + H₂O₂ + UV; **13. kuyucuk:** DNA + C_m(400 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **14. kuyucuk:** DNA + C_m(500 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **15. kuyucuk:** DNA + metanol; **16. kuyucuk:** DNA+ metanol + H₂O₂ + UV; **17. kuyucuk:** DNA.



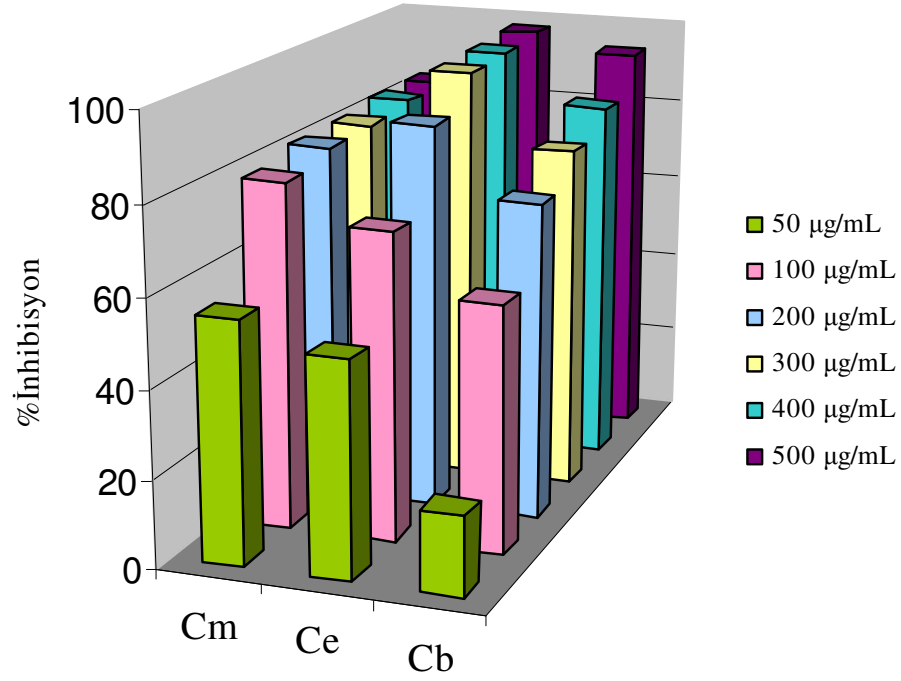
Şekil 4.16. (a) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II ve Form III yüzdeleri. **(b)** *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki etil asetat ekstraktının ve OH radikalini söndürücü olarak bilinen dimetilsülfoksit (DMSO), tiyoüre, potasyum iyodür (KI)'ün supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/L H₂O₂ içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 5 dk yapıldı.

1. kuyucuk: DNA; **2. kuyucuk:** Linearized pBluescript M13+DNA (Pst I digest); **3. kuyucuk:** DNA + H₂O₂ + UV; **4. kuyucuk:** DNA + UV; **5. kuyucuk:** DNA + H₂O₂; **6. kuyucuk:** DNA + DMSO(50 mM) + H₂O₂ + UV; **7. kuyucuk:** DNA + tiyoüre(10 mM) + H₂O₂ + UV; **8. kuyucuk:** DNA + KI(50 mM) + H₂O₂ + UV; **9. kuyucuk:** DNA + C_e(50 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **10. kuyucuk:** DNA + C_e(100 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **11. kuyucuk:** DNA + C_e(200 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **12. kuyucuk:** DNA + C_e(300 µg/mL) + H₂O₂ + UV; **13.kuyucuk:** DNA + C_e(400 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **14. kuyucuk:** DNA + C_e(500 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **15. kuyucuk:** DNA + metanol; **16. kuyucuk:** DNA+ metanol + H₂O₂ + UV; **17. kuyucuk:** DNA.



Şekil 4.17. (a) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II ve Form III yüzdeleri. **(b)** *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki n-butanol ekstraktının ve OH radikali söndürücü olarak bilinen dimetilsülfoksit (DMSO), tiyoüre, potasyum iyodür (KI)'ün supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/L H₂O₂ içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 5 dk yapıldı.

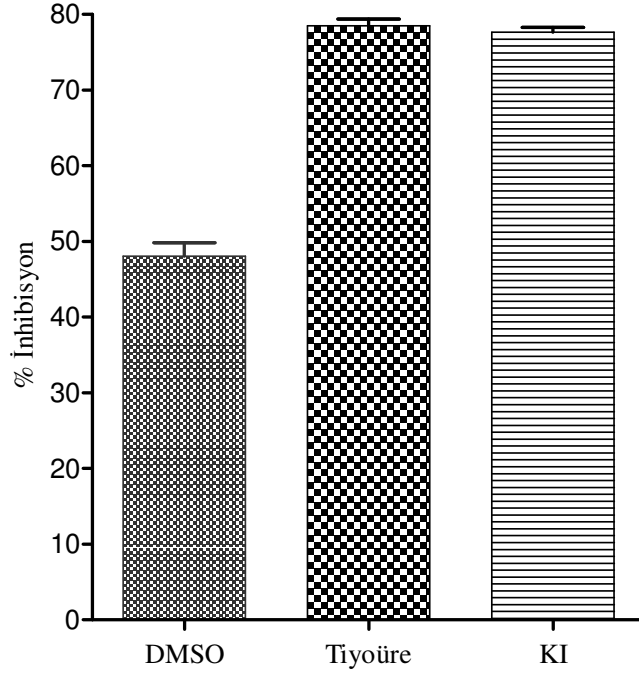
1. kuyucuk: DNA; **2. kuyucuk:** Linearized pBluescript M13+DNA (Pst I digest); **3. kuyucuk:** DNA + H₂O₂ + UV; **4. kuyucuk:** DNA + UV; **5. kuyucuk:** DNA + H₂O₂; **6. kuyucuk:** DNA + DMSO(50 mM) + H₂O₂ + UV; **7. kuyucuk:** DNA + tiyoüre(10 mM) + H₂O₂ + UV; **8. kuyucuk:** DNA + KI(50 mM) + H₂O₂ + UV; **9. kuyucuk:** DNA + C_b(50 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **10. kuyucuk:** DNA + C_b(100 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **11. kuyucuk:** DNA + C_b(200 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **12. kuyucuk:** DNA + C_b(300 µg/mL) + H₂O₂ + UV; **13. kuyucuk:** DNA + C_b(400 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **14. kuyucuk:** DNA + C_b(500 µg/mL)+ H₂O₂ + UV; **15. kuyucuk:** DNA + metanol; **16. kuyucuk:** DNA+ metanol + H₂O₂ + UV; **17. kuyucuk:** DNA.



Şekil 4.18. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki metanol, etil asetat ve n-butanol ekstraktlarının DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon grafiği.

Ekstraktlar	Konsantrasyon aralığı (μ g/mL)					
	50	100	200	300	400	500
Metanol	55,28	79,22	81,76	82,10	83,46	83,94
Etilasetat	49,28	70,38	88,55	96,18	96,67	97,86
n-Butanol	18,09	56,49	72,76	79,51	84,91	93,48

Tablo 4.6. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon değerleri.



Şekil 4.19. Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO, tiyoüre ve potasyum iyodür'ün DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon grafiği. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

	İnhibisyon değeri (%)
DMSO (50 mM)	47,90 ± 3,30
Tiyoüre (10 mM)	78,50 ± 1,55
KI (50 mM)	77,30 ± 1,13

Tablo 4.7. Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO, tiyoüre ve potasyum iyodür'ün DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

7. KAYNAKLAR

1. Harman, D., 1956. *Journal of Gerontology*, 11, 298-300.
2. McCord, J. M. & Fridovich, I., 1969. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
3. Babior, B. M., Kipnes, R. S., & Curnette J. T., 1973. *Journal of Clinical Investigation*, 52, 741-744.
4. Boveris, A., & Change, B., 1973. *Biochemical Journal*, 288, 341-344.
5. Turrens, J. F., & Boveris, A., 1980. *Biochemical Journal*, 191, 421-427.
6. Boffali, D., Scacco, S. C., Vergari, R., Solarino, G., 1994, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1226, 73-82.
7. Rossi F., Zabucchi, G., Dri, P., & Berton, G., 1979. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 121, 53-74.
8. Albich, J. M., McCarty, C. A., & Hurst, J. K., 1981. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 210-214.
9. Salin, M. L. & McCord, J. M., 1975. *Journal of Clinical Investigation*, 56, 1319-1323.
10. Brody, A. R., Hill, L. H., Adkins, B., Jr., & O' Connor, R.W., 1981. *American Review of Respiratory Disease*, 123, 670-679.
11. Mason, R. P., Kalyanaraman, B., Tainer, B. E., & Eling, T. E., 1980. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 5019-5022.
12. Griffith, O. W., 1985, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 4668-4672
13. Smith, B. J., Curtis, J. F., & Eling, T. E., 1991. *Chemico-Biological Interactions*, 79, 245-264.
14. Guengerich, F. P., 1990. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*, 25, 97- 153.
15. Guengerich, F. P., & Shimada, T., 1991. *Chemical Research in Toxicology*, 4, 391-407.
16. Dreher, D., & Junod, A. F., 1996. *European Journal of Cancer*, 32A, 30-38
17. Benzie, I. F., 1996. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 47, 233-261.
18. Blasig, I. E., Lowe, H., & Ebert, B., 1987. *Biomedica Biochimica Acta*, 46, S539-4.

19. Kumar, J. A., Agarwal, S., & Chatterjee, S. N., 1986. *Radiation & Environmental Biophysics*, 25, 309-314.
20. Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., & Sato, K., 1991. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 201S-205S.
21. Fraga, C. G., Zamora, R., & Tappel, A. L., 1989. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 270, 84-91.
22. Park, J. W., & Floyd, R. A., 1992. *Free Radical Biology & Medicine*, 12, 245-250.
23. Basu, A. K., Marnett, L. J., 1983. *Carcinogenesis*, 4, 331-333.
24. Yau, T. M., 1979. *Mech Ageing Dev*, 11, 137-144.
25. Marnett, L. J., 1999. *Mut Res Fund Mol Mech Mutagen*, 424, 83-95.
26. Mau, H., Schnetz-Boutaud, N. C., Weisenseel, J. P., Marnett, L. J., Stone, M. P., 1999. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6615-6620.
27. Davies, K. J., Delsignore, M. E., & Lin, S. W., 1987. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 8227-8234.
28. Schuessler, H. & Schilling, K., 1984. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine*, 45, 267-281.
29. Marcillat, O., Zhang, Y., Lin, S. W., & Davies, K. J., 1988. *Biochemical Journal*, 254, 677-683.
30. Davies, K. J. & Goldberg, A. L., 1987. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 8227-8234.
31. Davies, K. J., 1988. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 264, 503-511.
32. Rivett, A. J., 1985. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 12600-12606.
33. Demple, B., 1990. *Progress in Clinical & Biological Research*, 340A, 155-167.
34. Wei, H., & Frenkel, K., 1991. *Cancer Research*, 51, 4443-4449.
35. Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Kaji, H., & Kasai, H., 1997. *Nucleic Acids Research*, 25, 1897-1902.
36. Lindsberg, P. J., Ohman, J., Lehto, T., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Paetau, A., Wuorimaa, T., Carpen, O., Kaste, M., & Meri, S., 1996. *Annals of Neurology*, 40, 587-596.
37. Falcioni, G. C., Coderoni, S., Tedschi, G. G., Brunori, M., & Rotilio, G., 1981. *Biochimica et Biophysica Acta*, 678, 437-441.

38. Granger, D. N., Rutili, G., & Mccord, J. M., 1981. *Gastroenterology*, 81, 22-29.
39. Witztum, J. L., & Steinberg, D., 1991. *Journal of Clinical Investigation*, 88, 1785-1792.
40. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M.S., 1979. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America*, 76, 333-337.
41. Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S. S., Butler, S. W., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Steinberg, D., & Witztum, J. L., 1989. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 1372-1376.
42. Brown, M. S., Goldstein, J. L., 1986. *Science*, 232, 34-47.
43. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L., 1989. *The New England Journal of Medicine*, 320, 915-924.
44. Piotrowski, J. J., Shah, S., & Alexander, J. J., 1996. *Life Sciences*, 58, 735-740.
45. Guyton, K. Z., & Kensler, T. W., 1993. *British Medical Bulletin*, 49, 523-544.
46. Hsie, A. W., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M., & Schenley, R.L., 1986. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 9616-9620.
47. Von Sonntag, C., & Schuchmann, H. P., 1990. *Methods in Enzymology*, 186, 511-520.
48. Grollman , A. P., & Moriya, M., 1993. *Trends in Genetics*, 9, 246-249.
49. Bos, J. L., 1988. *Mutation Research*, 195, 255-271.
50. Larsson, R., & Cerutti, P., 1989. *Cancer Research*, 49, 562-5632.
51. Punnonen, K., Ahotupa, M., Asaishi, K., Hyoty, M., Kudo, R., & Punnonen, R., 1994. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 120, 374-377.
52. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M., 1993. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 548-555.
53. Harman, D., 1968. *Journal of Gerontology*, 23, 476-482.
54. Tolmasoff, J. M., Ono, T., & Cutler, R. G., 1980. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 2777-2781.
55. Lang C. A., Naryshkin, S., Schneider, D. L., Mills, B. J., & Lindeman, R. D., 1992. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 120, 720-725.

56. Loguercio, C., Taranto, D., Vitale, L. M., Beneduce, F., & Del Vecchio Blanco, C., 1996. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 483-488.
57. Siakotas, A. N., Armstrong, D., Koppang, N., & Connole, E., 1978. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17, 618-633.
58. Kennedy, S., & Rice, D. A., 1992. *Veterinary Pathology*, 29, 129-138.
59. Harman, D., 1972. *Journal of the American Geriatrics Society*, 20, 145-147.
60. Brunk, U. T., 1989. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 266, 313-20; discussion 321-2.
61. Takenaka, Y., Miki, M., Yasuda, H., & Mino, M., 1991. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 285, 344-350.
62. Schmidt-Nielsen, K., 1970. *Federation Proceedings*, 29, 1524-1532.
63. Pamplona, R., Prat, J., Cadenes, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez Torres, M., & Barja, G., 1996. *Mechanisms of Ageing & Development*, 86, 53-66.
64. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1995. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 125-126.
65. McCord, J. M., 1976. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 74, 540-550.
66. Demus-Oole, A., & Swierczewski, E., 1969. *Biologia Neonatorum*, 14, 211-218.
67. Casini, A. F., Maellaro, E., Del Bello, B., Comporti M., 1990. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 266, 105-110.
68. Meister, A., 1994. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 9397-9400.
69. Martensson, J., & Meister, A., 1991. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 88, 4656-4660.
70. Edwards, R., Gatehouse, J. A., 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, ENGLAND
71. Kutchan, T. M., 2001. *Plant Physiology*, 125, 58-60.
72. Wink, M., Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology, CRC Press, 1999.
73. Cowan, M. M., 1999. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
74. Gray, J. I., 1978. *JAGCS*, 55, 539.
75. Mouie, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., 2001. *Food Chemistry*, 72, 145

76. Shahidi, F., Naczk, M., *Food Phenolics Sources Chemistry Effects Applications*, Technomic Publication, PP. 235-277 USA 1995.
77. Stern, J. L., Hagerman, A. E., Steinberg, P. D., 1996. *Jornal of Chemicak Ecology*, 22, 1887-1899.
78. Duke, J. A., 1985. *Hanbook of Medicinal Herbs*.
79. Divon, R. A., Dey, D. M., Lamb, C. Y., 1983. *Advances in Enzymology and Telated Subjects of Biochemistry*, 55, 1-69.
80. Toda, M., Okubo, S., Ohnihi, R., 1989. *Japenese Journal of Bacteriology*, 45, 561-566.
81. Casley-Smith J. R., 1997. *Coumarins*, NEWYORK.
82. Phillipson, J. D., O'Neill, M. J., 1987. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 1, 131-144.
83. Davis, P. H., 1998. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, VOI. 10, Edinburg University Pres. Edinburg.
84. Baser, K. H. C., Sarikardesoglu, S., Tumen, G., 1994. *Journal of Essantial Oil Research*, 6, 9-12.
85. Baser, K. H. C., Kirimer, N., Kurkcuglu, M., Ozek, T., Tumen, G., 1996, *Journal of Essantial oil Resarch*, 8, 569-570.
86. Baser, K. H. C., Demirci, F., Kirimer, N., Hedge, I. C., 2001. *Chemistry of Natural Compounds*, 37, 336-338.
87. Tepe, B., Sökmen, M., Sökmen A., Daferera, D., Polissiou, M., 2005. *Journal of Food Engineering*, 69, 335-342.
88. Silinkard, K., Singleton, V. L., 1997. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
89. Chandler, S. F., Dodds, J. H., 1983. *Plant Cell Rep.* 2, 105.
90. Gülçin, İ., Küfrevioğlu, İ.Ö., Oktay, M., 2004. *Journal of Ethnopharmacology*, 90 (2-3), 205-215
91. Dorman, H. J. D., Hiltunen, R., 2004. *Food Chemistry*, 88, 193-199.
92. Tian, B., Hua, Y., 2005. *Food Chemistry*, 91, 413-418.
93. Wang, L., Yen, J-H., Liang, H-I., 2003. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 60-66.
94. Yen, G-C., Hsieh, C-L., 1998. *Food Chemistry*, 46, 3952-3957.

95. Mazumder, K. U., Rajeshwar, Y., Kumar, S., 2005. *European Bulletin of Drug Research*, vol 3.
96. Kumar, R. S., Sivakumar, T., Sunderam, R. S., 2005. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1015-1024.
97. Song, J. H., Simons, C., Cao, L., Shin, S. H, Hong, M., & Chung, M., 2003. *Experimental and Molecular Medicine*, 35(2), 67-75.
98. Lo, K. M., Cheung, C. K., 2005. *Food Chemistry*, 89, 533-539.
99. Kızıll, M., Yılmaz, E., Piriñçioğlu, N., Aytekin, Ç., 2003. *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 539-54.
100. Fukuhara, K., Miyata, N., 1998. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8, 3187-3192.
102. Shahidi, F., Wanasundara PKJPD, 1992. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
101. Pietta, P. G., 2000, *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035-42
103. Hatano, T., Edamatsu, R., 1989. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021.
104. Duh, P. D., Tu, Y. Y., Yen, G. C., 1999. *Lebnesmittel-Wissenschaft and Technologie*, 32, 269-277.
105. Gardon, M. H., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier, London, PP. 1-18.
106. Yamaguchi, F, Ariga, T., 2000, *Food Chemistry*, 48, 180-185.
107. Meneghini, R., 1997. *Free Radical Biology & Medicine*, 23, 783-792.
108. Bakirel, T., Şener, S., Bakirel, U., Kaleş, O., Şehnazlı, G., Gürel, A., 2003, *Journal Vet. Animal. Science*, 27, 1283-1292.
109. Borelli, F., Capasso, R., Ernest, E., 2004, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 497-510.
110. Halliwell, B., 1994, *Lancet*, 344, 721-724
111. Russo, A., Izzo, A., Borrelli, F., Renis, M., Vanella, A., 2003, *Phytotherapy Research*, 17, 870-875.

8. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 4.1. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının içindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları.

Tablo 4.2. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının, BHT ve α - tokoferol'ün DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri.

Tablo 4.3. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve EDTA' nın Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesinin % değerleri.

Tablo 4.4. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının ve DMSO'nun farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile OH radikalini söndürme gücü (%).

Tablo 4.5. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının ve α -tokoferolün lipit peroksidasyonunu önleme aktivitelerin % değerleri.

Tablo 4.6. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon değerleri.

Tablo 4.7. Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO, tiyoüre ve potasyum iyodür'ün DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon değerleri.

9. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1. Moleküler oksijenin indirgenmesi.

Şekil 1.2. Reaktif oksijen türlerinin biyolojik kaynakları ve hücrel hasarları.

Şekil 1.3 Arşidonik asit metabolizması ile tromboksan, prostasiklin ve prostaglandin sentezi.

Şekil 1.4. Serbest radikal ara basamağı ile prostaglandin sentezi.

Şekil 1.5. Lipit molekülünün metilen karbonundan bir hidrojen koparılması sonucu karbon merkezli lipit radikali oluşumu.

Şekil 1.6. Moleküler düzenleme ile konjuge dien oluşumu.

Şekil 1.7. Konjuge dienin moleküler oksijen ile reaksiyona girip lipit peroksil radikali oluşturması.

Şekil 1.8. Lipit peroksil radikalının başka lipit molekülleri ile reaksiyona girmesi ve zincir tepkimelerini başlatması.

Şekil 1.9. Son ürünün oluşumu.

Şekil 1.10. Malondialdehitin (MDA) sentezi ve DNA bazları ile reaksiyonu.

Şekil 1.11. Bitki sekonder metabolitlerin insan sağlığı üzerindeki biyolojik aktiviteleri.

Şekil 1.12. Primer metabolitlerden sekonder metabolitlerin oluşumu.

Şekil 1.13. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal ve antioksidant özellik gösteren sekonder metabolitler.

Şekil 1.14. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal ve antioksidant özellik gösteren sekonder metabolitler.

Şekil 3.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.

Şekil 3.2. DPPH radikalının indirgenmesi.

Şekil 3.3. Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu.

Şekil 4.1. Gallik asitin artan derişimlerine karşılık ölçülen absorbans değerleri.

Şekil 4.2. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi.

Şekil 4.3 *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi.

Şekil 4.4 *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi.

Şekil 4.5. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesi.

Şekil 4.6. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesi.

Şekil 4.7. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonunu şelatlama aktivitesi.

Şekil 4.8. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin methanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi.

Şekil 4.9. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi.

Şekil 4.10. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi.

Şekil 4.11. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%).

Şekil 4.12. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%).

Şekil 4.13. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin n-butanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%).

Şekil 4.14 *Cyclotrichium niveum* bitkisinin metanol, etilasetat ve n-butanol ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktiviteleri.

Şekil 4.15. (a) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II ve Form III yüzdeleri. (b) *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstraktının ve OH radikali söndürücü olarak bilinen dimetilsülfoksit (DMSO), tiyoüre, potasyum iyodür (KI)'ün supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/L H₂O₂ içerir.

Şekil 4.16. (a) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II ve Form III yüzdeleri. (b) *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki etil asetat ekstraktının ve OH radikali söndürücü olarak bilinen dimetilsülfoksit (DMSO), tiyoüre, potasyum iyodür (KI)'ün supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/L H₂O₂ içerir.

Şekil 4.17. (a) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II ve Form III yüzdeleri. (b) *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki n-bütanol ekstraktının ve OH radikali söndürücü olarak bilinen dimetilsülfoksit (DMSO), tiyoüre, potasyum iyodür (KI)'ün supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/L H₂O₂ içerir.

Şekil 4.18. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki metanol, etil asetat ve n-bütanol ekstraktının DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon grafiği.

Şekil 4.19. Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO, Tiyoüre ve potasyum iyodürün DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikale karşı koruyucu etkilerinin % inhibisyon grafiği.

Şekil 5.1. MDA 'nın proteinlerle etkileşmesi.

10. RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 3.1. *Cyclotrichium niveum*

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sevil EMEN
Doğum Tarihi: 15.12.1980
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri : Merkez/DİİYARBAKIR
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
21280-Diyarbakır
Telefon : **Ev :** (0412)2238854
GSM : (0535) 7727088
E-Mail: semen@dicle.edu.tr

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1987-Haziran 1999

İlkokul öğrenimimi Yunus Emre İlkokulunda, Ortaokulu Şair Sırrı Hanım İlköğretim Okulunda ve Lise Eğitimimi Ziya Gökalp Lisesinde (süper lise) tamamladım.

Eylül 2000-Temmuz 2004

Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdim.

Eylül 2004-Temmuz 2006

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “*Cyclotrichium niveum* Bitkisinin Farklı Polariteye Sahip Çözücüler ile Hazırlanan Ekstraktlarının Antioxidant ve DNA’yı Serbest Radikallerden Koruma Etkilerinin Araştırılması” adlı master tezini Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında tamamladım.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Çeken, B., S. Emen, M. Kızıl, “Süstitüe Aril Radikallerin Nükleik Asitler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” XIX. *Ulusal Kimya Kongresi*, BKP111, Kuşadası, 30 Eylül-4 Ekim 2005.

Katıldığı Kurslar:

24-28 Ocak 2005 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından düzenlenen “Serbest Radikaller, DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi” konulu Teorik Kursu katıldım.