

**KİMYASAL OLARAK SENTEZLENEN BAZI
BENZOFURAN SÜBSTİTÜE α - β DOYMAMIŞ KETON
TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Buket ERZEN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Harun EVREN

OCAK-2014

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYASAL OLARAK SENTEZLENEN BAZI BENZOFURAN SÜBSTİTÜE α - β
DOYMAMIŞ KETON TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Buket ERZEN

(08110202)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.01.2014

Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Ocak 2014

Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Harun EVREN (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Orhan ERMAN (F.Ü)

Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)

Doç. Dr. Ahmet ÇETİN (B.Ü)

Yrd. Doç. Dr. M. Fatih COŞKUN (F.Ü)

OCAK-2014

ÖNSÖZ

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, bir bilim insanı ve birey olarak hayatım boyunca örnek alacağım, çok değerli hocam Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ ve Prof. Dr. Harun EVREN ve Prof. Dr. Orhan ERMAN' a yoluma tuttuğu ışık, verdiği cesaret ve sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı tamamlamam için gerekli izinleri almama yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde emeği olan, bilgisi, deneyimi ve özverisi ile her işimi kolaylaştıran; sevgi dolu kalbiyle her umutsuzluğa kapıldığım anda beni yüreklendiren değerli ablam Demet COŞKUN, eniştem; Fatih Mehmet COŞKUN, arkadaşlarım; İrem DENİZ, Serhat ELÇİÇEK, Zehra GÖKÇE ve Ozan GEDİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında hiçbir yardımı esirgemeyen sevgili arkadaşım Ersin DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Sevgisiyle hayatıma kattığı değerler için eşim Mehmet Hadi ERZEN'e sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan sevgili aileme ve eşimin ailesine hiç bitmeyen sevgi ve destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmama destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne (FÜBAP) teşekkürlerimi sunarım.

Buket ERZEN

ELAZIĞ-2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
TABLolar LİSTESİ	XI
KISALTMALAR.....	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Benzofuran ve Türevi Bilesikler	3
1.2. Pirazoller ve Pirazolin.....	5
1.3. Serbest Radikaller	9
1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri.....	10
1.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	11
1.3.1.2. Hidroksil Radikali ($OH^\cdot$)	12
1.3.2. Non-Radikaller.....	13
1.3.2.1. Hipokloröz asit ($HOCl$).....	13
1.3.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	14
1.3.2.3. Singlet Oksijen.....	15
1.3.2.4. Nitrik Oksit	15
1.4. Serbest Radikal Kaynakları.....	17
1.4.1. Endojen Kaynaklı Serbest Radikal Kaynakları.....	17
1.4.2. Eksojen Kaynaklı Serbest Radikal Kaynakları	18
1.5. Serbest Radikallerden Etkilenen Hücresel Yapılar	19
1.5.1. Proteinlere Etkileri	20
1.5.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	20
1.5.3. Karbohidratlara Etkileri	21
1.5.4. Lipitlere Etkisi.....	22
1.6. Lipit Peroksidasyonu.....	22
1.6.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması	24
1.6.1.1 Başlama	24
1.6.1.2. Yayılma.....	24
1.6.1.3. Sonlanma.....	25

1.6.2.	Biyolojik Sistemlerde Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları	25
1.6.2.1.	MDA (Malondialdehit)	27
1.6.3.	Antioksidan Savunma Sistemleri	28
1.7.	Antoksidanların Sınıflandırması	30
1.7.1.	Endojen Antioksidanlar.....	31
1.7.1.1.	Enzimatik Antioksidanlar	31
1.7.1.1.1.	Glutasyon-S-Transferaz (GST)	31
1.7.1.1.2.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	31
1.7.1.1.3.	Glutasyon Redüktaz (GSSG-R).....	32
1.7.1.1.4.	Süperoksit Dismutaz (SOD).....	32
1.7.1.1.5.	Sitokrom Oksidaz.....	33
1.7.1.1.6.	Katalaz (CAT).....	33
1.7.1.2.	Enzim Olmayan Antioksidanlar	34
1.7.1.2. 1.	Lipit Fazda Bulunanlar:	34
1.7.1.2.1.1.	E Vitamini:	34
1.7.1.2.1.2.	Karotenoidler ve Retinol:	35
1.7.1.2.1.3.	Ubikinon	35
1.7.1.2.1.4.	Biluribin.....	36
1.7.1.2.1.5.	Melatonin.....	36
1.7.1.2.2.	Sıvı Fazda Bulunan Antioksidanlar	36
1.7.1.2.2.1.	C Vitamini (Askorbik Asit)	36
1.7.1.2.2.2.	Ürik Asit	37
1.7.1.2.2.3.	Seruloplazmin.....	37
1.7.1.2.2.4.	Transferrin	37
1.7.1.2.2.5.	Ferritin	37
1.7.1.2.2.6.	Albümin	37
1.7.1.2.2.7.	Glutasyon	38
1.7.1.2.2.8.	Haptoglobulin-Hemopeksin	38
1.7.2.	Eksojen Antioksidanlar	38
1.7.2.1.	Allopürinol – Oksipürinol.....	38
1.7.2.2.	NADPH-Oksidaz inhibitörleri	38
1.7.2.3.	Tiyoller.....	38
1.7.2.4.	Flavonoidler	38

1.7.3.	Oksidan-Antioksidan Dengenin Bozulması.....	41
1.8.	Glutasyon (GSH).....	43
1.8.1.	Glutasyon Sentezi ve Döngüsü.....	45
1.8.2.	GSH'in Biyokimyasal Önemi	46
1.8.3.	Glutasyonun Organizmadaki Biyolojik Görevleri.....	46
1.8.4.	Glutasyona Bağlı Enzim Sistemleri.....	47
1.8.5.	Glutasyonun Tayin Yöntemleri	48
1.8.5.1.	Spektrofotometrik Yöntem	48
1.8.5.2.	HPLC Yöntemi	48
1.8.5.3.	Fluorometrik Yöntem.....	49
1.9.	Yağ Asitleri.....	49
1.9.1.	Omega-3 Yağ Asitleri	52
1.9.2.	Omega-6 Yağ Asitleri	53
1.9.3.	Steroidler.....	53
1.10.	Vitaminler	54
1.10.1.	A Vitamini.....	55
1.10.2.	D Vitamini.....	56
1.10.3.	E Vitamini (α - tokoferol)	57
1.10.4.	K Vitamini.....	58
1.11.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
2.	MATERYAL ve METOD	65
2.1.	Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler.....	65
2.2.	Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar	65
2.3.	İnceleme Materyali	65
2.4.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kültürünün Hazırlanması.....	66
2.5.	Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi.....	66
2.6.	<i>In vitro</i> Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) ölçümü:	67
2.7.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın Gelişme Ortamında Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi	68
2.7.1.	Maya Hücresinde Glutasyon Miktarının Ölçülmesi.....	68
2.7.2.	Glutasyon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması.....	69
2.7.3.	Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi.....	69
2.7.4.	Protein Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	70

2.8.	Maya Hücresinden Lipidlerin Ekstraksiyonu	71
2.8.1.	Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması.....	71
2.8.2.	Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz kromatografik Analizi	72
2.9.	Maya Hücresinde ADEK Vitaminleri ve Kolesterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi.....	72
3.	BULGULAR.....	74
3.1.	Organik Maddelerin DPPH Radikali Temizleme Etkisi	74
3.2.	Madde Gruplarının <i>In vitro</i> Ortamda Antioksidan Etkileri	75
3.3.	Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'da Glutasyon (GSH), Malondialdehit (MDA) ve Total Protein Sentezi Üzerine Etkisi	76
3.4.	D4, D5, D10 Kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi.....	78
3.5.	D2 ve D11 kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi	80
3.6.	D3, D8, D9 Kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi.....	81
3.7.	D1ve D6 Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi ..	82
3.8.	D2 ve D11 Kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi	83
3.9.	D4, D5, D10 Kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi	85
3.10.	D8, D9, D3 Kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi	86
3.11.	D1ve D6 Kodlu Madde Gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi	87
4.	TARTIŞMA	88
4.1.	Benzofuran Türevi Organik Maddelerin <i>In vitro</i> Ortamda Etkileri.....	90
4.2.	Anaerobik Kültür Ortamda Madde Gruplarının Etkisi	93
5.	KAYNAKLAR	103
	ÖZGEÇMİŞ.....	121

ÖZET

Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş ve daha önce herhangi bir biyolojik aktivite testine tabi tutulmamış, bazı benzofuran süstitüe α - β doymamış keton türevi bileşiklerinin, *Saccharomyces cerevisiae* bulunan anaerobik kültür ortamında ve *in vitro* da antioksidan etkileri araştırıldı. Çalışmada lipid peroksidasyon (LPO), yağ asidi düzeyi, lipofilik vitamin değerleri, protein ve glutatyon miktarları ve MDA düzeyleri ölçüldü. Bu amaçla kontrol, fenton reaktifi (FR) ve organik maddeleri içeren gruplar kullanıldı.

Bulgularımıza göre organik maddelerin DPPH serbest radikal temizleme etkisi karşılaştırıldığında; D5 ve D6 kodlu maddelerin diğer maddelere göre oldukça belirgin oranda radikal temizleme etkisinin olduğu belirlendi. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak bu grupların etkinliği karşılaştırıldığında ise; D5, D6 ve D8 kodlu maddelerin DPPH serbest radikal temizleme etkisinin belirgin düzeyde arttığı saptanmıştır ($p<0.001$).

Madde gruplarının *in vitro* ortamda LPO üzerine etkileri kontrole göre karşılaştırıldığında; D5 ve D8 kodlu maddelerin MDA miktarını önemli ölçüde azalttığı saptandı ($p<0.001$).

D1, D2, D5, D7, D9, D8, D10, D11 kodlu maddelerin kontrole kıyasla; ergosterol miktarında belirgin düzeyde artışa neden olduğu ($p<0.001$), dolayısıyla mayadan ergosterol sentezini arttırmak için yapılan çalışmalara yardımcı olabileceği ve böylece biyoteknolojik alanda da önemli olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzofuran, pirazolin, glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), antioksidan, fitosterol, lipid peroksidasyon, yağ asidi, *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF SOME CHEMICALLY SYNTHESIZED BENZOFURAN SUBSTITUTED α - β UNSATURATED KETONE DERIVATIVES

In this study, the antioxidant effects of the newly synthesised benzofuran substituted α - β unsaturated ketone derivative compounds which was not subjected to any biological activity test before, was investigated *in vitro* on *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions. In the study lipid peroxidation (LPO), fatty acid levels, the lipophilic vitamin values, protein and glutathione concentrations and MDA levels were measured. For this purpose, Fenton 's reagent (FR) and the organic substance containing groups were used as the control.

According to our findings when DPPH free radical scavenging effect of the organic matters were compared; D5 and D6 coded substances have significantly higher radical cleaning ability than others. When the activities were compared in terms of increasing concentrations of these groups; D5, D6 and D8 coded substances have significantly higher DPPH radical cleaning ability ($p < 0.001$).

When the effects of the substance groups on the LPO were compared to control *in vitro*, D5 and D8 coded substances reduced the amount of MDA significantly ($p < 0.001$).

D1, D2, D5, D7, D9, D8, D10, D11 have shown remarkable level of increase in the amount of ergosterol ($p < 0,001$) which may assist the studies of increasing the synthesis of ergosterol from yeast and thus supports that they are important in biotechnology field.

Keywords: Benzofurans, pyrazoline, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), antioxidant, phytosterol, lipid peoxidation, fatty acids, *Saccharomyces cerevisiae*.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Benzofuranın molekül yapıları, halkanın numaraları ve rezonans katkı formülleri.....	3
Şekil 1.2.	Bezofuran türevleri.....	4
Şekil 1.3.	Bezofuran türevleri.....	5
Şekil 1.4.	Elektron taşıma zinciri ve süperoksit radikalının açığa çıkması	11
Şekil 1.5.	L-Arginin- NO yolağı.....	16
Şekil:1.6.	Radikal üretimi, hedef yapılar ve riskler	18
Şekil 1.7.	Geçiş metallerinin katalizi ile radikal üretimi ve lipit peroksidasyonu	20
Şekil 1.8.	Serbest radikallerin oluşumu, biyolojik moleküllerin hasara uğratılması ve lipid peroksidasyon olayı sonucunda sekonder ürünlerin oluşması	23
Şekil 1.9.	Biyomembranlarda serbest radikallerin uyardığı lipit peroksidasyonu.....	26
Şekil 1.10.	Manoldialdehit (MDA) yapısı.	27
Şekil 1.11.	Linoleik asidin OH• radikalının bulunduğu ortamda lipid peroksidasyona uğraması ve son ürün olarak farklı aldehid moleküllerinin oluşması.....	28
Şekil 1.12.	Reaktif oksijen türlerinin etkilerine karşı <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de gerçekleşen antioksidan savunma mekanizmaları ve redoks tepkimeleri	33
Şekil 1.13.	Lipid peroksidasyonu ve katalaz'ın etki mekanizması.....	34
Şekil 1.14.	Flavonoidler	39
Şekil 1.15.	Glutasyon'un (GSH) yapısı	44
Şekil 1.16.	Glutasyon döngüsü	46
Sekil 1.17.	Glutasyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri	47
Şekil 1.18.	Doymuş ve doymamış yağ asitleri	50
Şekil 1.19.	Yağ asitleri.	50
Şekil 1.20.	Doymuş yağ asitleri.....	52
Sekil 1.21.	Omega-3 ve Omega-6 yağ asitleri.....	53
Şekil 1.22.	Steroidler	54
Şekil 1.23.	A vitamini (retinol) üç boyutlu kimyasal yapısı	55
Şekil 1.24.	K vitamini türevleri	59
Şekil 1.25.	<i>S. cerevisiae</i> 'nin yaşam döngüsü.	62

Şekil 1.26.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'ye ait makroskopik ve mikroskopik (fleurosanmikroskop, elektron mikroskobu) görüntüler	63
Şekil 2.1.	DPPH radikalının giderilmesi	67
Şekil 2.2.	Glutasyon kalibrasyon eğrisi	69
Şekil 2.3.	Protein kalibrasyon eğrisi	71
Şekil 3.1.	Madde gruplarının DPPH radikali temizleme etkisi	74
Şekil 3.2.	Madde gruplarının <i>in vitro</i> ortamda lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri.....	75
Şekil 4.1.	Mayalarda azollerin, ergosterol biyosentezini inhibe etme mekanizması.....	98

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Reaktif Oksijen Türleri	10
Tablo 1.2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri.....	21
Tablo 1.3. Başlıca ekzojen antioksidanlar ve özellikleri [62,114].....	40
Tablo 1.4. Bilinen endojen antioksidanlar ve etkinlikleri [62,114].	41
Tablo 1.5. Serbest radikallerin radikal olmayanlarla başka radikaller oluşturmak üzere girebilecekleri reaksiyonlar ve bazı örnekler [89].	43
Tablo 3.1. D11, D2 kodlu maddelerin <i>S. cerevisiae</i> 'de glutatyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH), Malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein(mg/g) sentezi üzerine etkisi.....	76
Tablo 3.2. D4, D5, D10 kodlu maddelerin <i>S. cerevisiae</i> 'de glutatyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH), malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein(mg/g) sentezi üzerine etkisi.....	76
Tablo 3.3. D3, D8, D9 kodlu maddelerin <i>S. cerevisiae</i> 'de glutatyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH) , malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein (mg/g) sentezi üzerine etkisi.....	77
Tablo 3.4. D1, D6, D7 kodlu maddelerin <i>S. cerevisiae</i> 'de glutatyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH), malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein(mg/g) sentezi üzerine etkisi.....	78
Tablo 3.5. Dz-46, Dz-58, Dz-107 kodlu madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g/lg}$).....	79
Tablo 3.6. D2, D11 kodlu madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g/lg}$).....	80
Tablo 3.7. D8, D9, D3 kodlu madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g/lg}$).....	81
Tablo 3.8. D1, D6 kodlu madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g/lg}$).....	83
Tablo 3.9. D11, D2 kodlu organik madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine ekisi	84

Tablo 3.10.D4, D5, D10 kodlu organik madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi	85
Tablo 3.11. D8, D9, D3 kodlu organik madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi	86
Tablo 3.12. D1, D6 kodlu organik madde gruplarının <i>S. cerevisiae</i> 'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi	87

KISALTMALAR

ROT	: Reaktif Oksijen Türlerini
DNA	: Deoksiribonükleotid
UV	: Ultraviyole
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
RBL-1	: Rat Basophil Leukemia Cells
HCC	: Hepatoselüler karsinom
ADP	: Adenozin Difosfat
B16	: Fare Cilt Tümörü
HCT 116	: İnsan Kalın Bağırsak Kanseri
A31	: İnsan Epitelyum Tümörü
HUVEC	: İnsan Umbilical Ven Endotel Hücreleri
5-HT	: 5-Hydroxytryptamine
COX-2	: Siklooksijenaz-2
GSH	: Glutasyon
MDA	: Malondialdehit
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
NOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
VLDL	: Very-Low-Density Lipoprotein
LDL	: Low-Density Lipoprotein
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
LPO	: Lipid Peroxide
SOD	: Süperoksit Dismütaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
GSSG-R	: Glutasyon Redüktaz
CAT	: Katalaz
ROS	: Reactive Oxygen Substance
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
OPT	: O-phthalaldehyde
MUFA	: Monounsaturated Fatty Acid

PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acid
EPA	: Eikosapentenoik Asit
ALA	: Alfa-linolenik asit
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
DVR	: D Vitamini Reseptörü
DBP	: D-Binding Protein
UVB	: Ultraviyole B
MK-4	: Menaquinon-4
PGI2	: Prostrasiklin

1.GİRİŞ

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma bazal koşullarda dahil, prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturur [1]. DNA, lipidler, proteinler gibi biyolojik moleküllerin prooksidan hasarına karşı koymada endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlara gereksinim vardır. Eğer prooksidanlar aşırı olursa oksidatif stres ya da oksidatif hasar meydana gelir. İnsanlardaki birçok hastalık (kanser, kardiyovasküler düzensizlikler vb.) prooksidan hasara eşlik eder. Bu hastalıkların antioksidanlar tarafından önlenmesi konusu son yıllarda tıbbi literatürde önemli bir yer tutmaktadır. Antioksidanlar etkilerini reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu önleyerek ve/veya ROT'ni temizleyerek gösterirler, Eksojen kaynaklı antioksidanların birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda bulunmaktadır. Bunlar, bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller ve diğer bileşikler kapsamaktadır [2]. Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir. Sayıları 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır [2-3]. Canlı organizmalar veya hücreler üzerinde antioksidan etkiye sahip olan aktif biyolojik moleküllerden biri de kalkon türevleridir.

Doğal ya da sentetik bileşikler olan kalkonlar ve türevleri flavonoidlerin heterosiklik C halkasına sahip olmayan bileşikleridir ve geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler [4]. Flavonoidlerin temel yapısındaki propan zinciri üzerinde α,β -doymamış karbonil grubunun bulunması, yani bir çift bağ ve bir keton grubunun konjuge biçimde yer alması, kalkonları ortaya çıkarır. Kalkon ifadesi 1,3-diari 1-2- propen-1-on yapısı içeren bütün bileşikler için kullanılır.

Kalkonların, karsinogenezin gelişimini engelleyen ve dokularda iyileştirici etki gösteren anti kanser ajanlarının bir sınıfı olduğu ileri sürülmüştür. Yenilebilir bitkilerde bol olan flavonoid ve izoflavonoidlerin öncüsü olan moleküller gibidir [5]. Yapılan çalışmalarda kalkonların; antikanser [6] antiinflamatuvar [7] antiinvasiv, antitüberküloz ve antifungal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bunların yanısıra; antioksidant, antimalarial, antileishmanyal ve antitümör ajanı oldukları da rapor edilmiştir.

Biyolojik olarak kullanıldıkları kadar, polimerlerde UV-absorbsiyon filtreleri olarak farklı türdeki optik materyallerde, yiyecek endüstrisinde ve holografik kayıt teknolojileri

gibi birçok uygulama alanında da kullanılırlar [8]. Bir ketovinil grubuna sahip çok sayıda bileşiğin önemli derecede biyolojik aktivite gösterdiği iyi bilinen bir gerçektir [9]. Kalkonlar da ketovinil grubu içeren bileşikler arasındadır ve gösterdikleri biyolojik aktiviteden dolayı kalkonlar üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

Lin vd. [10], bir dizi kalkon ve flavonoid türevinin öldürücü ve bulaşıcı bir hastalık olan tüberküloza karşı aktivitelerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonunda iki kalkon türevinin ve dört kalkon tipi bileşiğin tüberküloz bakterisine karşı % 90'ın üzerinde inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Florlanmış 3,4-dihidroksikalkonlar üzerinde yaptıkları çalışmada, kalkonların antiperoksidasyon ve *in vitro* (bir test tüpü içerisinde) şartlarda antitümör olarak biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu kalkonların fare bazofilik lösemi-1 hücreleri (RBL- 1) üzerinde 5-lipoksigenaz inhibisyonu ve fare karaciğer mikrozomlarında Fe^{+3} -ADP indüklenmiş NADPH-bağımlı lipid peroksidasyon üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca 6-floro-3,4-dihidroksi-2,4-dimetoksikalkonun kullanılan bir insan kanser hücre kültürü paneli (HCC) üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür [11].

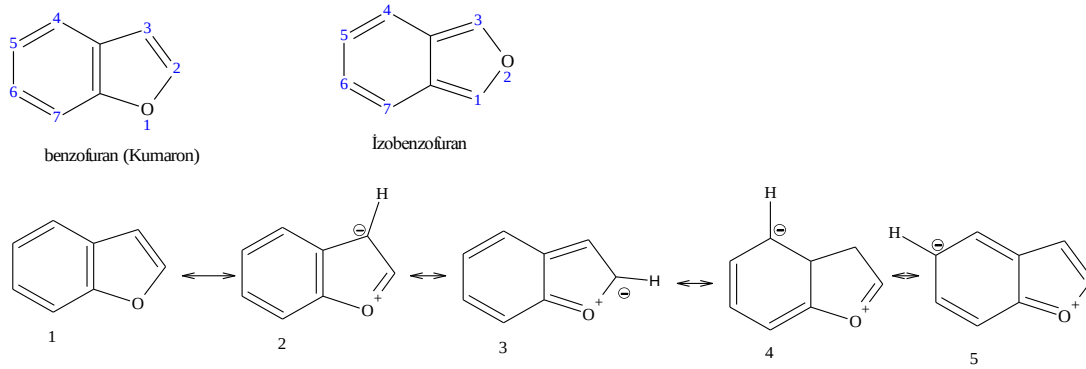
Kalkonların pek çok faydalı özelliklerinin yanı sıra sitotoksik etkileri de bulunmaktadır. Nam vd. [12], bir dizi 2,5-dihidroksikalkon türevlerinin tümör hücre kültürlerine (B16 fare cilt tümörü, HCT 116 insan kalın bağırsak kanseri, A31 insan epitelium tümörü) karşı ve insan göbeğine ait damarlı endotel hücrelerine (HUVEC) karşı sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. İncelenen kalkon türevleri arasından birkaç molekülün, düşük mikromolarda IC50 değerleri ile yalnızca tümör hücre kültürlerine karşı değil endotel hücre kültürü HUVEC'e karşı da belirgin sitotoksik seçicilik gösterdiği rapor edilmiştir. Yeni kan damarlarının endotel hücrelerinden oluşumu (anjyogenez) katı tümör gelişmesinin bir ön koşuludur, anjyogenezin inhibisyonu gelişmeyi ve kanserli tümörlerin çoğalmasını sınırlandıracaktır. Bu sonuçlara dayanarak Nam vd. [12], kalkonların potansiyel anjyogenez inhibitörü olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Ayrıca, kalkonların yapılarında α,β -doymamış sistem içermeleri onları kimyasal olarak da önemli kılmaktadır ve çok sayıda hetero halkalı bileşiğin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılmaktadırlar.

1.1 Benzofuran ve Türevi Bilesikler

Furanın monobenzen türevleri, 2,3-benzofuran ve 3,4-benzofurandır. Kumaron adı verilen 2,3-benzofuran (benzofuran), kaynama noktası 170 °C olan bir sıvıdır, kararsızdır, kolay polimerleşir. Kumaron'dan elde edilen sentetik reçine, yağlıboya katkı maddesi olarak kullanılabilir [13]. Bazı benzofuranlar, doğal olarak bulunmaktadır. Örneğin; 5-metoksi benzofuran; 5-üyelı halkalı yapı olup, anti-bakteriyal özelliklere sahip doğal bir benzofurandır [13]. Bu örnekten de anlaşıldığı gibi doğada bulunan benzofuranların biyolojik aktivite gösterdikleri ortadadır. Benzofuran türevleri, kozmetik ve sentetik ilaç kullanımında geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Doğal benzofuranların çoğu, fizyolojik, farmakolojik ve toksik özelliklere sahiptir [14].

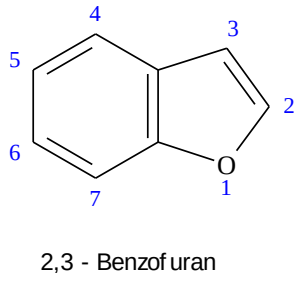
Benzofuranın molekül yapıları, halkanın numaraları ve rezonans katkı formülleri aşağıda gösterilmiştir.



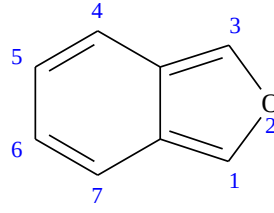
Şekil 1.1. Benzofuranın molekül yapıları, halkanın numaraları ve rezonans katkı formülleri

Furanın 2,3-benzo türevi olan benzofuran birçok bakımdan furan ile benzerlik gösterir. Rezonans formülünden görüldüğü gibi, pozitif yük O atomu üzerinde bulunur. Elektrofilik sübstitüsyonda başlıca α -sübstitüsyonuna ve çok daha az olmak üzere β -sübstitüsyonuna uğrar. Bu durumda, elektrofilik sübstitüsyonda yapılan (2) ve (3) rezonans formüllerinin katkısı (4) ve (5)'den daha fazladır [15].

Karbofuran gibi benzofuran türevleri önemli antioksidan ve pestisit etkilere sahiptir. Bu bileşikler 5-HT₁ (5-Hydroxytryptamine) antagonistlerinin temel taşları olarak da önemli bir rol oynarlar [16].



2,3 - Benzofuran



3,4 - Benzofuran

Şekil 1.2. Bezofuran türevleri

Benzofuranların geçmiş birkaç yıl içinde en önemli dikkat çeken özelliklerinden birisi de kemoterapik özellikler göstermeleridir [17].

Çok iyi bilinen bazı benzofuranlar, amiodarone, angelicin, xanthotoxin, bergapten, nodekenetin ve usnik asit bileşikleridir. Bu benzofuranlar, kardiyovasküler aktivite özelliğine sahiptirler. Amiodarone, kalp yetersizliği bulunan hastalarda, atar damar sistemindeki ritimsizliğin tedavisinde kullanılır [18].

Usnik asit, gram-pozitif organizmaların çoğalmasını engeller ve *Mycobacterium tuberculosis* üzerinde inhibisyon etkisi gösterir. Bergapten, nodakenetin, xanthotoxin bazı deri hastalıklarının tedavisinde kullanılır.

Salvia miltorrhiza bitkisinden izole edilen bileşik Çin’de koroner kalp hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır [19].

Allanthoidol adlı benzofuran türevinin, virüslere karşı etkili, kanserden koruyucu, böcek öldürücü, ateş düşürücü vs. gibi önemli özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur [20].

Benzofuran türevlerinin, COX-2 inhibitörü, böcek öldürücü, ateş düşürücü, tümör oluşumunu engelleyici, verem mikrobunu öldürücü, mikroorganizmaları inhibe edici [21], iltihap kurutucu, antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve antioksidan gibi etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [22]. Yapısal izomerlerin sentezi, biyolojik aktivite ve kimyasal yapı arasındaki ilişkinin aydınlatılması için gereklidir. Benzofuran türevlerinin sentezi de bu amacı hedeflemektedir.

Radl vd. [22], yaptıkları çalışmada bu bileşiklerin ağrı kesici etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Kırılmış vd. [18] ile Wahab vd. [17] yapmış oldukları araştırmalarda benzofuran ve türevlerinin antimikrobial etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Papadakivaliraki ve ark. [23] benzofuran türevi bileşiklerinin antiviral etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Masubuchi vd. ile Singh vd. [24] bu bileşiklerin

antifungal özelliklerinin olduğunu yapmış oldukları araştırmalarında belirtmişlerdir.

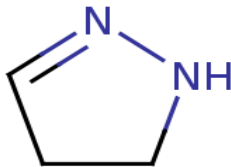
Baraldi vd. [25], Hayakawa vd. ile Radi vd. [26], benzofuran türevi bileşiklerin antitümör etkilerini ortaya koymak için yaptıkları araştırmada bu bileşiklerin tümör gelişimini durdurduğu ve tümörü geriletmediğini belirtmişlerdir. Connor vd. [27], yapmış oldukları araştırmada bu bileşiklerin; antialerjik özelliğe sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Davis vd. [28] ile Ohno vd. [29], bu bileşiklerin kan basıncını düşürücü olduklarını gözlemlemişlerdir.

Grisar vd. [30] ile Bindoli vd. [31], benzofuran türevi bileşiklerin lipit peroksidasyonu sonucu oluşan oksidanları ve sülfhidril grup oksidanlarıyla etkileşerek bu oksidanları yok ettiği ve dolayısıyla antioksidan olduğunu yapmış oldukları araştırmalarda belirtmişlerdir.

Cowley vd. [32], yapmış oldukları araştırmada benzofuran türevi bileşiklerinin tokoferolün analogu gibi özellikler gösterdiğini belirtmişlerdir.

1.2. Pirazoller ve Pirazolin

Pirazoller, 2 azot ve 3 karbon atomunun oluşturduğu beşli halkayı içeren hetero halkalı bileşiklerdir. Pirazol'un izomeri imidazoldür. Aralarındaki fark pirazoldeki iki azot atomu birbirleriyle direkt bağlıdır. Pirazol, çok kararlı bir bileşiktir. Polimerleşme ve reçineleşme göstermez. Zayıf bir bazdır ve tuzları vakum ile kolaylıkla ayrılabilir. Ayrıca suda kolaylıkla çözünür. Pirazol, 60-70 °C'de kaynar. Kokusu piridine benzer; alkol, eter ve benzende çözünür [33]. Pirazol halkasının kısmen redüklenmiş türevleri olan pirazolinler pirazoller gibi totomerik yapı gösterirler, bu yapıların en kararlı olanı 2-pirazolin yapısıdır.



2-pirazolin

Şekil 1.3. Benzofuran türevleri

Pirazolin türevi bileşiklerin yüksek düzeyde antibakteriyal aktivitelerinin yanı sıra antifungal, antiinflamatuvar, antidepresan, aneljezik vb. olmak üzere birçok aktiviteyi yapısında bulunduran önemli bir grup olduğu yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir [34-35].

1.2.1. Etkinliği Araştırılacak Olan Organik Maddeler

Etkinliği araştırılacak olan organik maddeler aşağıda verilmiştir. Bu çalışmada biyolojik etkinliği araştırılacak olan organik maddeler şunlardır:

1-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(3-hidroksifenil)prop-2-en-1-on (**D1**)

2-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on (**D2**)

3-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(4-hidroksifenil)prop-2-en-1-on (**D3**)

4-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(1H-pirol-2-il)prop-2-en-1-on (**D4**)

5-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)prop-2-en-1-on(**D5**)

6-3-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il]fenol (**D6**)

7-2-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il]fenol (**D7**)

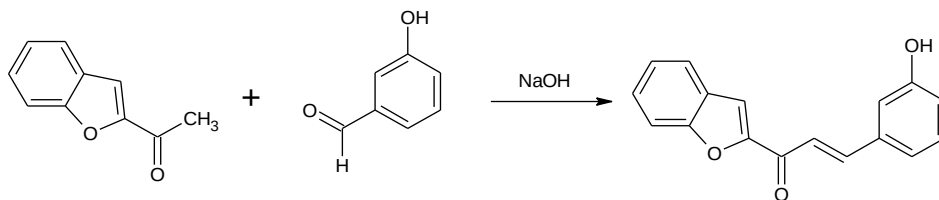
8-4-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il]-2-metoksifenol (**D8**)

9-4-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il]fenol (**D9**)

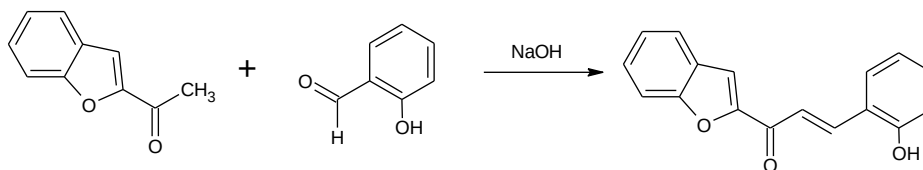
10-1,4-Bis[3-(benzofuran-2-il)-2-pirazolin-5-il]benzen (**D10**)

11-3-(1-benzofuran-2-il)-5-(1H-pirol-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol (**Dz11**)

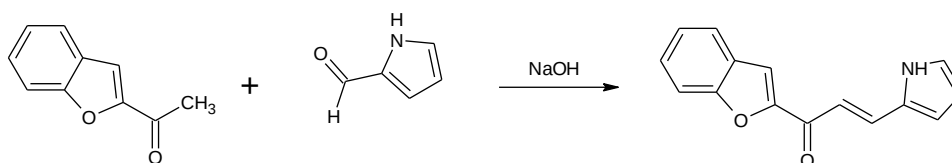
1-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(3-hidroksifenil) prop-2-en-1-on



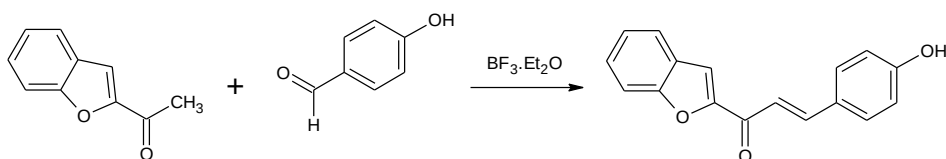
2-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(2-hidroksifenil) prop-2-en-1-on



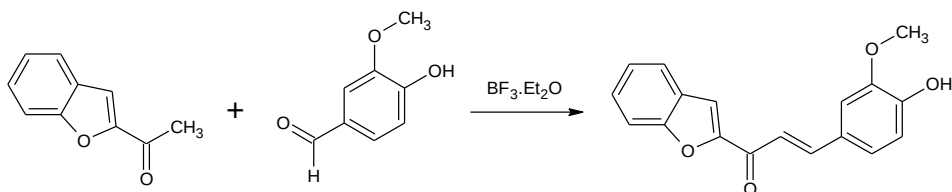
3-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(1H-pirol-2-il) prop-2-en-1-on



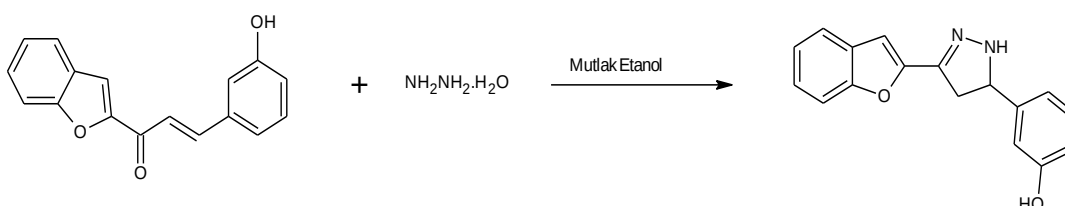
4-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(4-hidroksifenil) prop-2-en-1-on



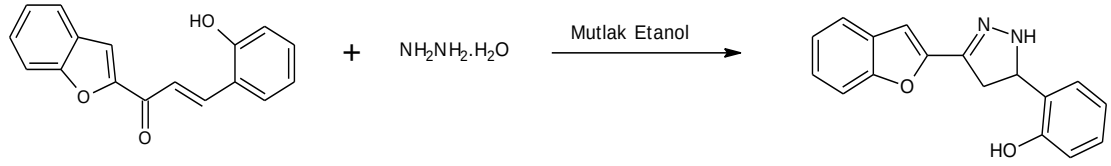
5-(2E)-1-(1-benzofuran-2-il)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil) prop-2-en-1-on



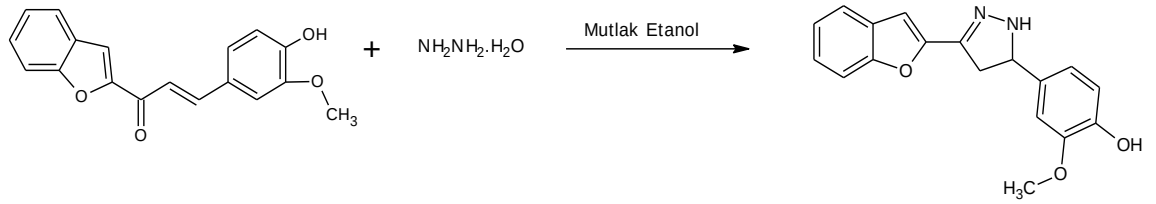
6- 3-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il] fenol



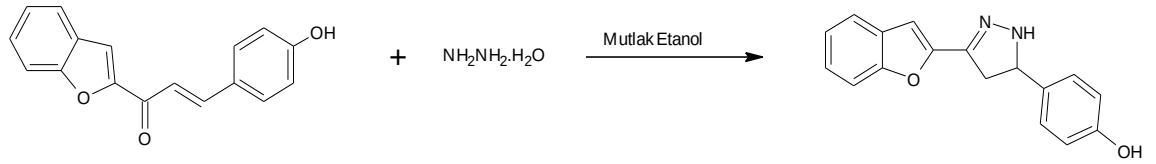
7- 2-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il] fenol



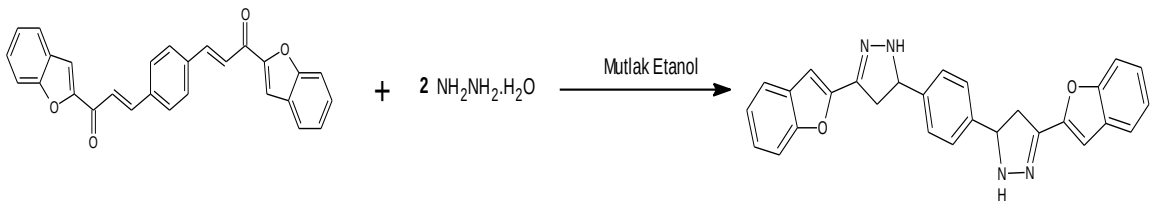
8-4-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il]-2-metoksifenol



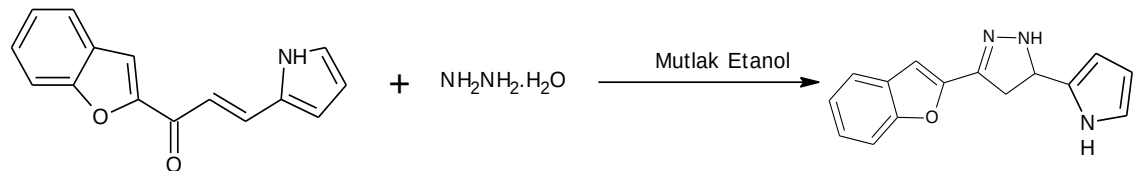
9 -4-[3-(1-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il]



10- 1,4-Bis[3-(benzofuran-2-il)-2-pirazolin-5-il]benzene



11- 3-(1-benzofuran-2-il)-5-(1H-pirol-2-il)-4,5-dihidro-1H- pirazol



Antioksidan, GSH, protein, vitamin, MDA gibi parametrelerle biyolojik aktivitesine bakılan benzofuran türevi bileşiklerin açık formülleri yukarıda gösterilmiştir.

1.3. Serbest Radikaller

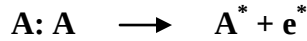
Serbest radikaller elektron düzenleri bozulduğu için kararlılıklarını kaybetmiş ve bu yüzden reaktif hal almış atom veya molekül formlarıdır. Stabil bir molekülde elektronlar, dış orbitalde çift olarak bulunmakta, böylece her bir elektronun zıt spine sahip bir eşinin olması sağlanarak kararlı bir yapı oluşmaktadır. Eğer son yörüngedeki orbital elektron alırsa veya kaybederse, yani atom veya molekül bir veya daha çok sayıda çiftlenmemiş elektron taşır hale gelirse, yapı artık bir serbest radikal halini almakta ve manyetik momentum göstermektedir [36].

Serbest radikaller pozitif ve negatif yüklü veya yüksüz olarak bulunabilmekte, hem oksidan hem de redüktan olarak görev yapabilmektedirler [36]. Kararlı bir molekül genel olarak üç şekilde serbest radikal halini almaktadır [37].

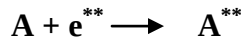
1. Kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi:



2. Tek elektron kaybı veya heterolitik bölünme: Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomlardan birinde kalır.



3. Tek elektron alma: Biyolojik sistemlerden en yaygın olan şeklidir.



4. Biyolojik sistemlerde radikal üretimi daha çok elektron transferi ile olmaktadır [36].

İki serbest radikalın reaksiyonunda her iki madde de radikal özelliklerini kaybetmekte, radikal olmayan diğer bir yapıyla reaksiyonundan ise diğer bir serbest radikal oluşmaktadır [38].

1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

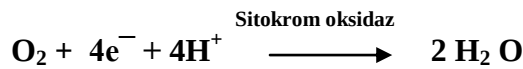
Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan *p* orbitalinde iki elektron eksik olduğundan "diradikal" olarak kabul edilmektedir [36].

Oksijen diradikal durumunda iken radikal olmayan yapılarla yavaş, serbest radikallerle ise kolayca reaksiyona girebilmektedir [36].

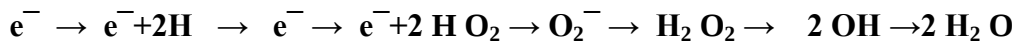
Aslında oksijen, aerobik hücrelerde oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretiminde kullanılması zorunlu olan bir maddedir [37-39]. Oksijen moleküllerinin %95-99'u oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriyal sitokrom oksidazlar ile 4 elektron alarak suya dönüştürülmekte ve sonuçta ATP sentez edilmektedir [34, 40]. Ancak bu zincirden sızan oksijenin %1-5'i çeşitli toksik maddelere dönüşmektedir [36, 39].

Solunum zincirindeki normal ve ROT oluşturan reaksiyonlar aşağıdaki gibidir [41].

Normal Fizyolojik Reaksiyon:



Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu:

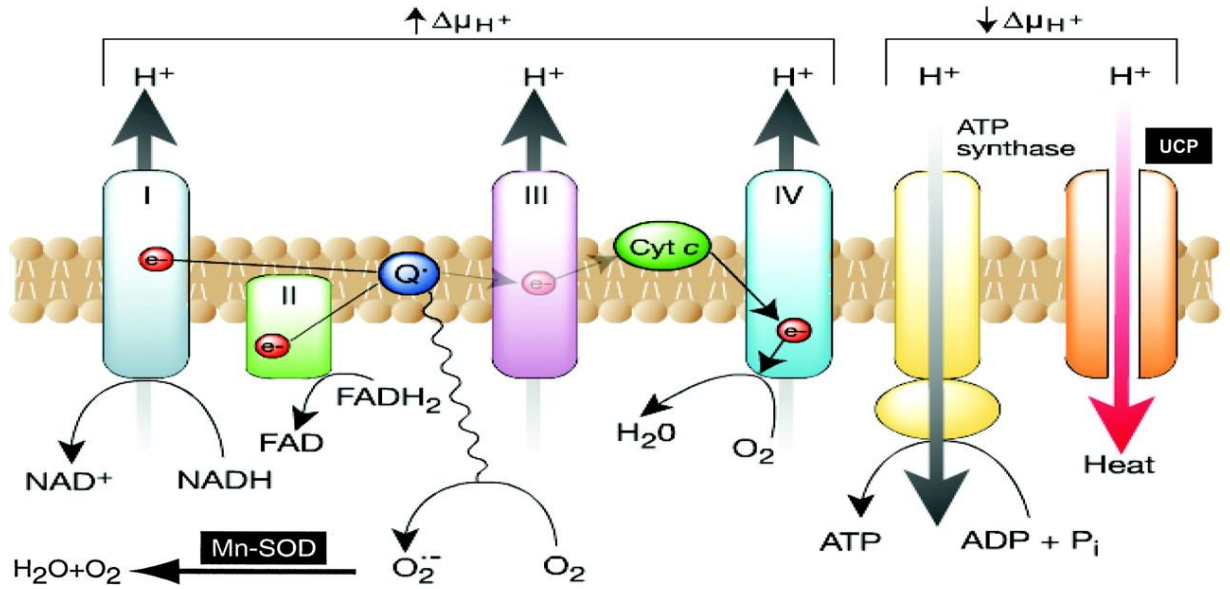


Tablo 1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksid anyon radikali (O_2^-)	Hidrojen peroksid ($\text{H}_2 \text{O}_2$)
Hidroksil ($\text{HO} \cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Peroksil ($\text{ROO} \cdot$)	Ozon (O_3)
Alkoksil ($\text{RO} \cdot$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Nitrik oksit ($\text{NO} \cdot$)	Lipit hidroperoksid (LOOH)
Semikinon radikali ($\text{HQ} \cdot$)	Peroksinitrit ($\text{ONOO} \cdot$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller ($\text{R} \cdot$)	N-halojenli aminler (R-NH-X)
Organik peroksid radikali ($\text{RCOO} \cdot$)	Hipohalöz asid (HOX)

Oksidanlar, ortaklanmamış elektron içerdiklerinden dolayı başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve ortaklanmamış elektronları olmadığı halde başka moleküllerle, radikallerden daha zayıf bir şekilde bileşenler (nonradikaller) olmak üzere iki grupta toplanmaktadırlar [42-43].

Oluşan bu maddeler "reaktif oksijen serbest radikalleri" ya da oksidan moleküller olarak adlandırılmaktadır. Organizmanın oksijen ihtiyacının artmasıyla mitokondriyal elektrontransport zinciri ortaklanmamış elektron çiftinin artışına bağlı olarak reaktif oksijentürleri meydana gelir. Normal seviyelerin üzerinde bir O_2 konsantrasyonu ile karşılaşmanın vücutta çeşitli toksik etkilere yol açtığı uzun zamandan beri bilinmektedir [37].



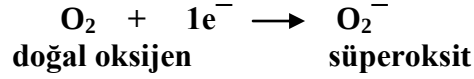
Şekil 1.4. Elektron taşıma zinciri ve süperoksit radikalinin açığa çıkması

1.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

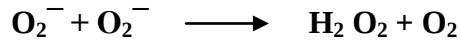
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali (O_2^-) meydana gelir [42-44].

Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir. Böylece oluşan peroksi anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir. Süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen

peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit hem redüktan hem de oksidandır [44].

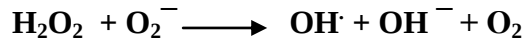


İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir. Süperoksit radikalının ortamdaki temizlendiği bu tepkimeye *dismütasyon tepkimesi* denir.



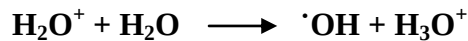
1.3.1.2. Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\cdot$)

Hidrojen peroksitin, süperoksit ile indirgenmesi sonucu oluşur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir [45].

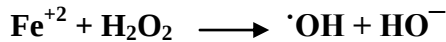


Hidroksil radikalının yapımına neden olan önemli tepkimeler şunlardır:

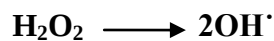
a) İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi:



b) Fenton tepkimesi:

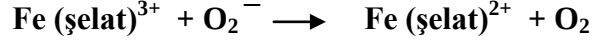


c) Hidrojen peroksidin fotolizi:

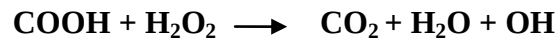


d) Ozona elektron transferi ile OH oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde $\text{OH}^\cdot$ 'in önemli rolü vardır.

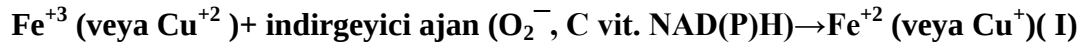
- e) *In vivoda* OH üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. *In vivoda* O_2^- radikalının H_2O_2 ile OH üretmesi şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.



- f) Radikal tepkimeleri sonucu oluşabilen bir organik radikal, H_2O_2 ile tepkimeye girerek OH üretebilir.



- g) Hidroksil radikalının mekanizması ise iki reaksiyon sonucunda gerçekleşir.



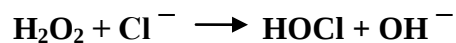
Görüldüğü gibi O_2^- radikalının elektron verici olduğu tepkime Haber-Weiss tepkimesi dışında da biyolojik moleküller metal iyonlarını indirgeyerek H_2O_2 varlığında OH yapımını sağlarlar [46].

Hidroksil radikali en reaktif ve en zarar verici oksidan radikaldır. Su dahil, ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden $OH^\cdot$ radikalının başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir [47].

1.3.2. Non-Radikaller

1.3.2.1. Hipokloröz asit (HOCl)

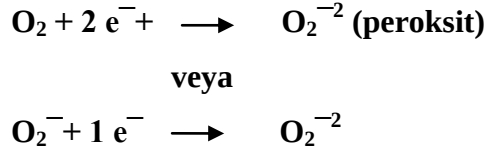
Hidrojen peroksit molekülünün bir klor atomu (Cl) ile reaksiyona girmesi sonucu hipokloröz asit oluşur.



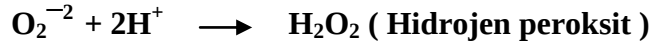
HOCl, fagositik hücreler tarafından bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit, makrofajlar ve eozinofiller O_2^- radikalini üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz eder. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla O_2^- 'nin dismütasyonu ile H_2O_2 'i klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyal ajan olan HOCl'e dönüştürür [48].

1.3.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

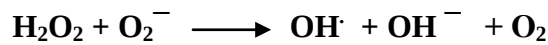
Oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur.



Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti meydana getirir.



H_2O_2 , hücre membranlardan kolay geçebilen bir oksidandır. Yüksüz ve boyutlarının küçük olması biyolojik membranlardan geçişini kolaylaştırır. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metal iyonları varlığında daha da hızla gerçekleşen bir reaksiyonla süperoksit anyon radikali ile birlikte en reaktif ve en zarar verici serbest radikal olan hidroksil radikali kolayca yıkılabilir [36, 44].



Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerlerken, demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise oldukça hızlıdır [44].

Peroksizomlar çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Bu organeldeki D- amino asid oksidaz, urat oksidaz, L- hidroksil asid oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar. Fakat peroksizomlarda katalaz aktivitesi çok yüksektir. Bu sebeple bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir [44].

1.3.2.3. Singlet Oksijen

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet oksijenin sigma ve delta olmak üzere iki tipi vardır [49].

Sigma formu çok enerjik olduğundan yarı ömrü kısadır, hızlıca bozularak delta formuna dönüşür [50].

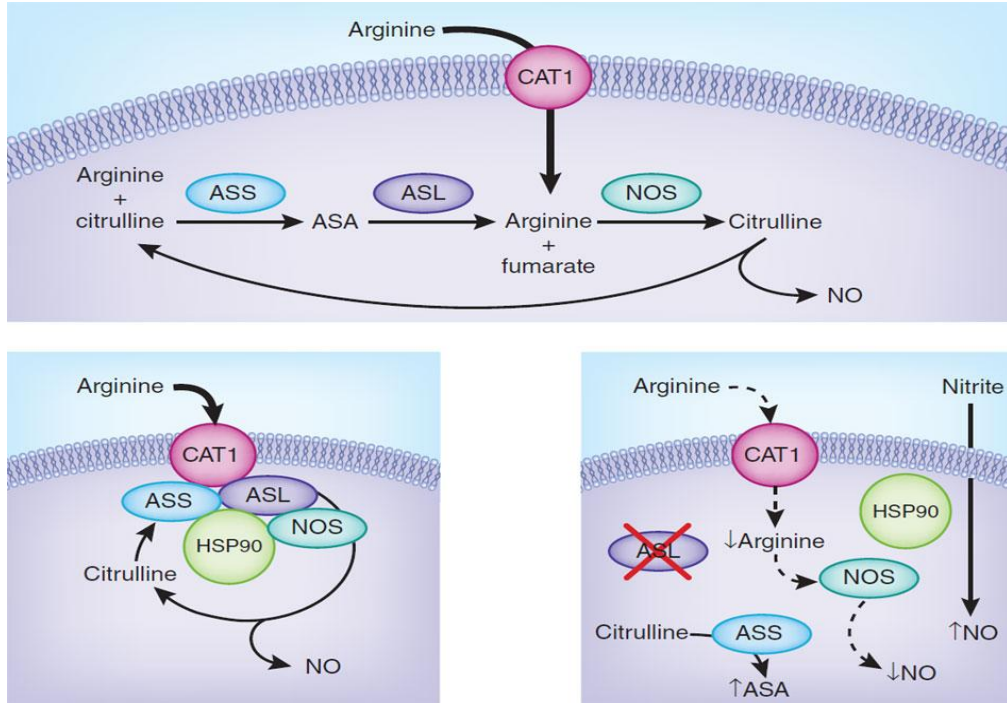
Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi *in vivo* olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonlarıyla da oluşabilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2-5-difenilfuran, 1,4-diazbisikloalefan singlet oksijeni temizlerler [41]. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve steroller kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur [50].

1.3.2.4. Nitrik Oksit

Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen azot merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında azot atomuna ait ise de, bu elektronun hem azot hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından daha uzun ömürlüdür. Yukarıda özetlendiği gibi, oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO dışında, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimleridir.

Nitrik oksit NOS enzimi yardımı ile yarı esansiyel amino asit olan L-argininden oksidatif deaminasyon sonucunda sentezlenir [51].

Nitrik oksit sentetaz enziminin nöronal (nNOS), endotel (eNOS) ve indüklenabilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır. eNOS ve nNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci (messenger) molekül olarak kullanılır. Haberci molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini artırır. cGMP ise çeşitli enzimler yardımıyla hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar.



Şekil 1.5. L-Arginin- NO yolağı

Nitrik oksit sentetazın indüklenabilir (iNOS) formu ise başta fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir [52].

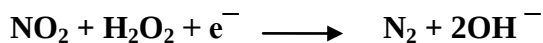
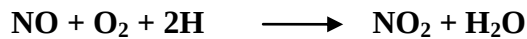
iNOS enzimin aktivitesi kalsiyumdan bağımsız olup kontrol edilemediğinden ortamda arjinin bulunduğu sürece aktif olup uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizler. Radikal olarak aktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle (örneğin hücre zarında)

tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik (düşük) derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır [53].

Oksijen radikalindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir; derişimin artması ile oksidasyon hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle iNOS enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif azot oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücrel proteinlerin, enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler [54].

Çeşitli kirleticilere maruz kalan organizmada ozon ve nitrojen oksitler gibi serbest radikaller meydana gelir [55].

Ozonda bulunan bütün elektronlar çiftlenmiş olduklarından, paramagnetik değildir ve oksijenin aksine daha polardır. Bu nedenle suda daha fazla çözünür [56]. Nitrik Oksit ve Nitrojen Dioksit serbest radikaller olup, doymamış $\text{C}=\text{C}$ bağlarına saldırarak direkt olarak lipid peroksidasyonuna neden olur. NO moleküler oksijenle reaksiyona girerek NO_2 oluşturur. Bu da H_2O_2 ile reaksiyona girerek OH^- meydana getirir [57].



1.4. Serbest Radikal Kaynakları

1.4.1. Endojen Kaynaklı Serbest Radikal Kaynakları

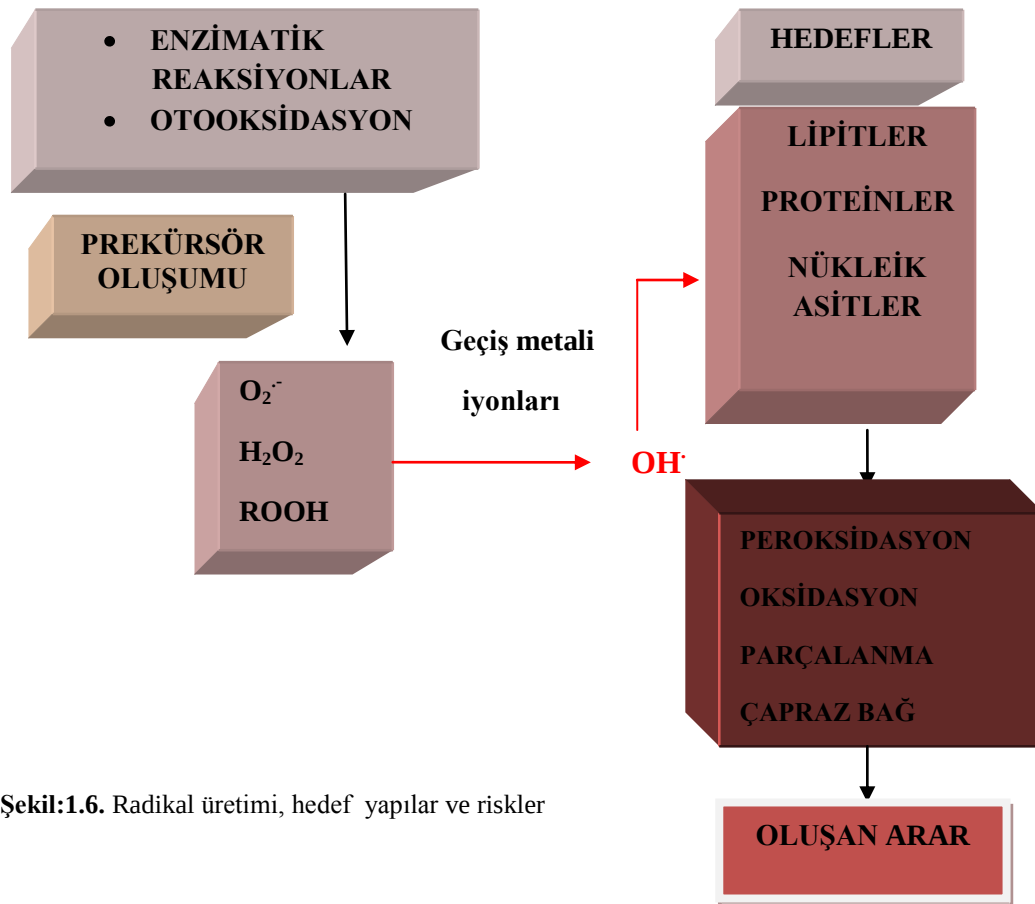
- Mitokondriyal elektron transport sistemi reaksiyonları
- Oksijenaz enzimlerinin reaksiyonları
- Antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması
- Otooksidasyon reaksiyonlar

1.4.2. Eksojen Kaynaklı Serbest Radikal Kaynakları

- Radyoaktivite
- Ultrason
- Ksenobiyotikler (Yabancı kimyasallar) [58].

Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır [59].

Bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler. Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksitin derişimleri genellikle çok düşüktür.



Şekil:1.6. Radikal üretimi, hedef yapılar ve riskler

Düşük derişimlerdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından aktif olmayan şekle dönüştürüldüklerinden önemli zararlı etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli hastalık durumlarında artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paraleldir. Örneğin iltihap durumlarında aktifleşen lökositler aynı anda hem oksijen radikallerini hem de nitrik oksiti yüksek konsantrasyonlarda sentezlerler. Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur.

1.5. Serbest Radikallerden Etkilenen Hücresel Yapılar

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Serbest radikaller hücrelerin; DNA, lipit, protein, karbonhidrat ve enzim gibi önemli biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar [36-60].

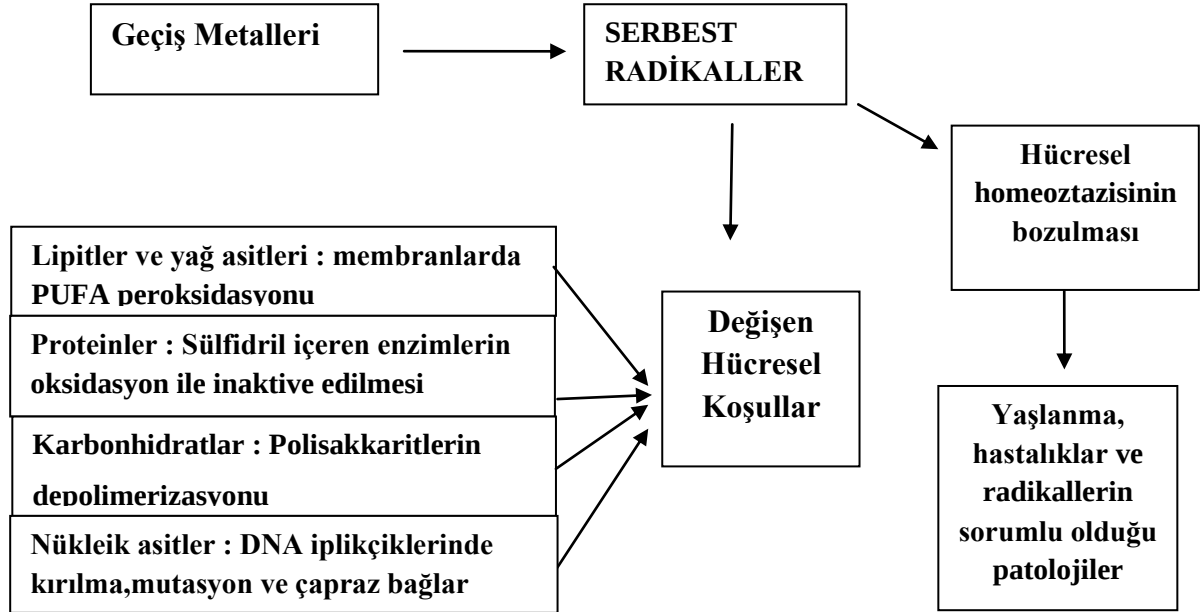
Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır.

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı; hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- a) DNA' nın tahrip olması,
- b) Nükleotit yapıli koenzimlerin yıkımı,
- c) Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- d) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- e) Protein ve lipitlerle kovalent bağlantılar yapması,
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- g) Seroid ve yas pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover” nin artması
- i) Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi

j) Kollogen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması

k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir [61-62].



Şekil 1.7. Geçiş metallerinin katalizi ile radikal üretimi ve lipid peroksidasyonu

1.5.1. Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipidlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. Albumin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur [63].

1.5.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek mutasyona neden olur ve hücre ölümüne yol açarlar. Bu zararlı etki kromozom değişikliklerine sebep olur. Hidroksil radikali bazlar ile kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA daha kolay zarar görebilen bir moleküldür [64].

1.5.3. Karbohidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Oksidan maddelerin karbohidrat metabolizması üzerine etkisi, glikolitik ATP sentezinin azalması ve ATP kullanımının artması yönündedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar [44]. Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Özellikle iyi kontrol edilemeyen diyabette oksidatif aktivitenin artması sonucu serbest radikal oluşumun arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı bildirilmiştir [65].

Yapılan bir araştırmaya göre diyabetiklerde plazma ve eritrosit lipit peroksit düzeylerinin sağlıklı kişilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir [66].

Tablo 1.2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipitlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbohidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Kükürtlü aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağlanma Enzimlerde inhibisyon
Nükleik asitler	Tek ve çift iplik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar

1.5.4. Lipitlere Etkisi

Çoğu biyomoleküller serbest radikallerden etkilenirler. Fakat lipitler serbest radikallere karşı en hassas olanlarıdır. Organizmada en çok görülen serbest radikal hasarı lipit peroksidasyonu şeklinde olup, membranda doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen çıkmasıyla lipit (L) radikali oluşur ve zincir şeklindeki reaksiyonların sonunda sitotoksik ürünler olan aldehitler ayrıca pentan gibi hidrokarbon gazları meydana gelir. Bu toksik ürünlerden aldehitlerin en son basamağında yer alan malondialdehit (MDA) ise lipit peroksidasyonunun saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [67].

Serbest radikallerin oluşumu hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa, membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup, hücrenin diğer bölümlerine hasar yayarlar. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Orotik asit, etanol ve fosfor tarafından meydana getirilen karaciğer hasarını lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [67- 68].

1.6. Lipit Peroksidasyonu

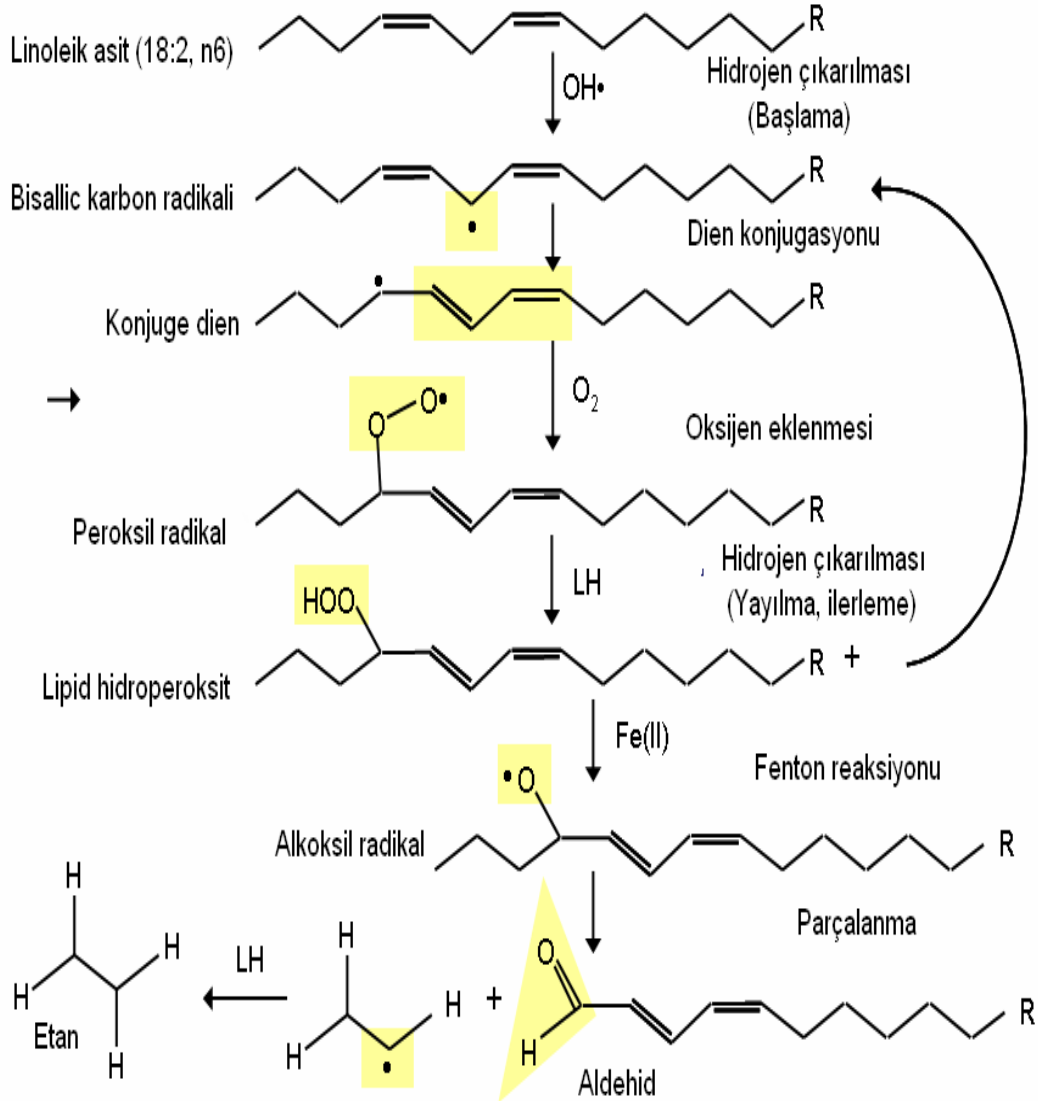
Biyolojik yapılar, özellikle membranlar yüksek oranda doymamış yağ asidi içermektedir. Doymamış yağ asitleri bir radikal başlatıcısının veya serbest oksijenin varlığında oksidasyona uğramaktadırlar. Bu olay lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmakta olup peroksidasyon olayı için genellikle bir enzimin varlığı gerekli değildir. Lipid peroksidasyonunun şiddeti lipidlerin doymamışlık derecesi ile orantılıdır [69-70].

Peroksidasyona uğramış olan poliansatüre yağ asitlerinden oluşan 3 karbonlu bileşik malondialdehidtir. Birçok biyolojik makromoleküle reaktivitesi olan malondialdehit yoğun olarak çalışılmıştır. Malondialdehid, araşidonik asid, birçok lipoksid, hidroperoksit, endoperoksit, prostaglandin ve tromboksanlardan oluşur.

MDA serbest olarak ya da değişik doku bileşenleri ile kompleks şekilde bulunabilir. *In vivo* iyonize radyasyon ile serbest radikal üretimi sonucu bazı makromoleküllerin oksidatif yıkılımı sonucu oluşur. Prostaglandin biyosentezi de MDA oluşumuna yol açar, ancak unsatüre (doymamış) yağ asitlerinin peroksidasyonu ana kaynaktır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, selüler düzeyde metabolize edilir. Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik olarak yıkılıma uğrar. CO₂'e metabolize olur,

mitokondriyal yolda yıkılabilir, idrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda ekskrete edilir. MDA hücre hasarında yol aldığı gibi yaşlanma pigmentleri olan lipofüsinlerin oluşumunda da etkilidir. MDA' nın mutajenik özellikleri olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir [71].

Plazma lipid peroksid düzeylerine yaş ve cinsiyetin etkili olduğu bildirilmektedir. Yaş arttıkça lipid peroksidleri yükselmektedir [72].



Şekil 1.8. Serbest radikallerin oluşumu, biyolojik moleküllerin hasara uğratılması ve lipid peroksidasyon olayı sonucunda sekonder ürünlerin oluşması

Bu yükselme VLDL ve LDL fraksiyonlarındaki lipid peroksidlerin artışına bağlıdır. HDL lipid peroksidleri ise yaşla değişmemektedir. Oklüziv arter hastalığı bulunan hastalarda lipid peroksid düzeyleri yüksek bulunmuştur [61]. Artmış olan lipid peroksidleri

damar duvarındaki endotel ve intima hücrelerinin hasar verdikleri bilinmektedir. Lipid peroksidleri trombosit agregasyonunu da etkilemekte ve damar tonusunu azaltan bir bileşik olan prostasiklin (PGI₂) sentezini de inhibe etmektedirler [73].

LDL' nin içeriğindeki unsatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile MDA ve diğer peroksidasyon ürünleri oluşur. Bu oksidasyon ateroskleroza başlatıcı hasarın önemli nedenlerindendir [74].

1.6.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle uyarılan lipit peroksidasyonu başlama, yayılma ve sonlanma reaksiyonları olmak üzere üç aşamada gerçekleşir [75].

1.6.1.1 Başlama

Peroksidasyon, serbest radikallerin doymamış yağ asitlerinin yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomu çıkartmak için yaptıkları atakla başlar. Demir ve bakır gibi eşlenmemiş elektronlara sahip olan geçiş iyonlarının varlığı peroksidasyonun başlaması için gereklidir. Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması karbon atomu üzerinde eşlenmemiş bir elektron bırakır ve karbon merkezli radikal (L[•]) oluşumuna yol açar. Aerobik hücrelerde sık görülen bu olay radikallerin moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksi radikalini (LOO[•]) üretmesidir [75].

1.6.1.2. Yayılma

Bu peroksi radikali diğer bir peroksi radikali ile birleşir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksi radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomu çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonu yaymalarıdır. Böylece yan zincirlerden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipit hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksi radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon, bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zincirleri lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir.

Yayılma zincirinin uzunluğu birçok faktöre bağlıdır;

1. Membrandaki lipit/protein oranı: Membran proteini ile etkileşen radikalın etkisi, membranın protein içeriği arttıkça yükselir.

2. Yağ asidi bileşimi radikalın membranda doymamış yağ asidi içeriğinin artması peroksidasyona olan duyarlılığı arttırmaktadır. Halbuki kolesterolün varlığı peroksidasyonu baskılamaktadır. Normal insan eritrositlerinde lipit peroksidasyonunun derecesi ile membran kolesterol konsantrasyonu arasında belirgin bir negatif korelasyon bulunmuştur. Plazma membranında kolesterolün varlığı bazı radikallerin yollarının kesilmesine neden olduğu gibi yağ asidi zinciri ile kolesterolün hidrofobik halkasının etkileşmesi membranın iç yapısını değiştirir.

3. Oksijen konsantrasyonu.

4. E vitamini gibi zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanların varlığı: Biyolojik membranlarda serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapan E vitamini kendi hidrojen atomunu peroksi radikallerine vererek hidroperoksitlerin oluşumuna yol açar. Bu hidroperoksitler daha sonra glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile kendilerine karşılık gelen nontoksik hidroksi bileşiklerine ayrılmaktadır [75].

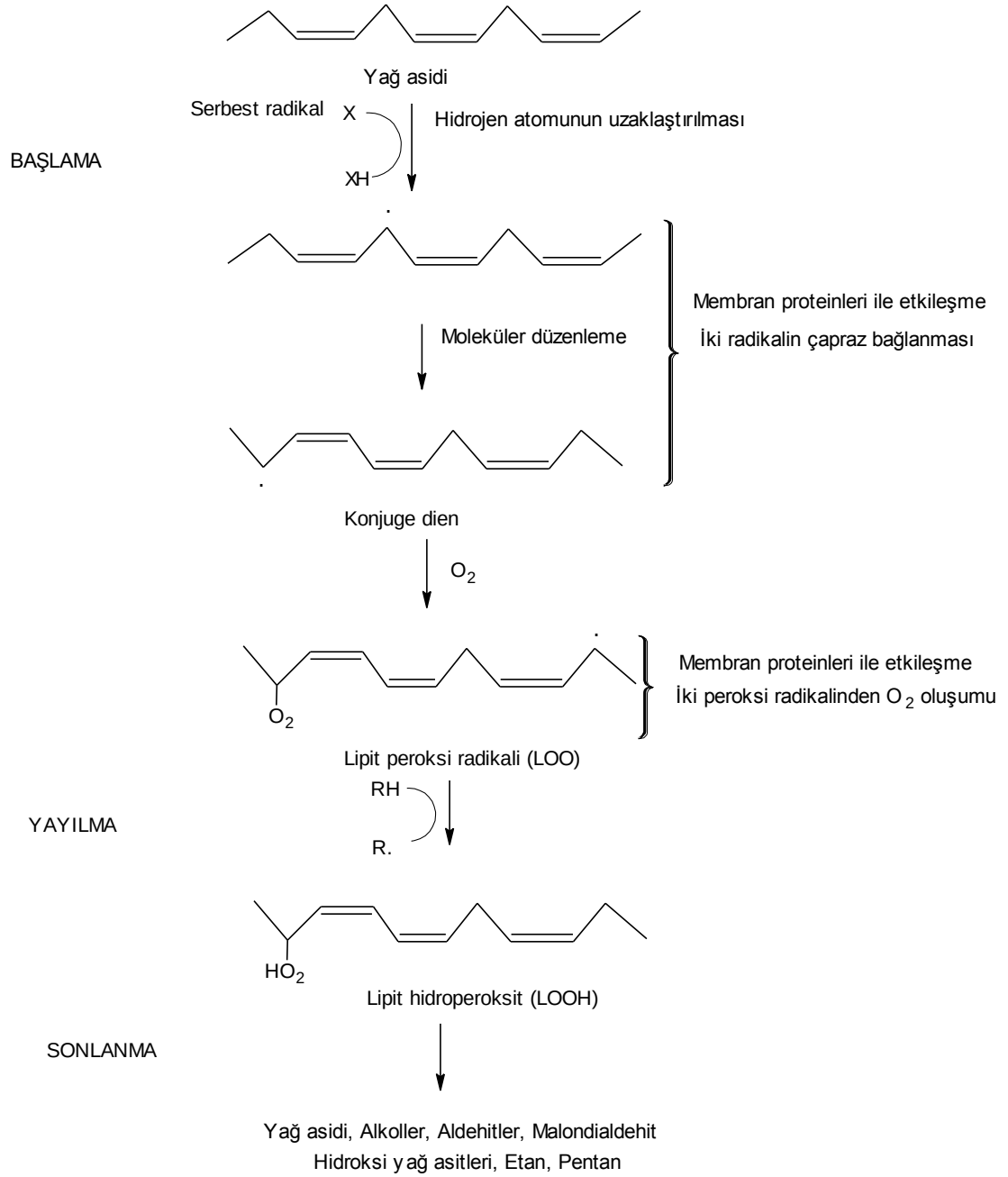
1.6.1.3. Sonlanma

Demir ve bakır iyonları veya bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe^{+2} ADP), hem, hemoglobin ve miyogloblin içeren bazı demir proteinleri lipit hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının ürünlerini; etan, pentan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO gruplarını içeren kısa zincirli yağ asitleridir [75].

1.6.2. Biyolojik Sistemlerde Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları

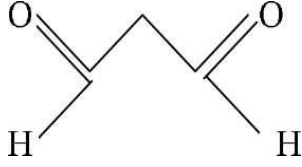
Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır. Lipit hidroperoksitleri ve lipit peroksi radikalleri serbest oksijen radikalleri gibi aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek sellüler ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkilerini şu şekilde gösterirler [75-79].

- Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar.
- Membranın salgılama fonksiyonunun kaybına neden olurlar.
- Trans membran iyon gradiyentini bozarlar. Ca^{+2} gibi iyonlara karşı non spesifik permeabilityi arttırırlar.
- Mitokondride oksidatif fosforilasyonu olumsuz yönde etkilerler.
- Mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açarlar.
- Subsellüler organellerin (lizozom gibi) bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.



Şekil 1.9. Biyomembranlarda serbest radikallerin uyardığı lipit peroksidasyonu

1.6.2.1. MDA (Malondialdehit)



Şekil 1.10. Malondialdehit (MDA) yapısı [77].

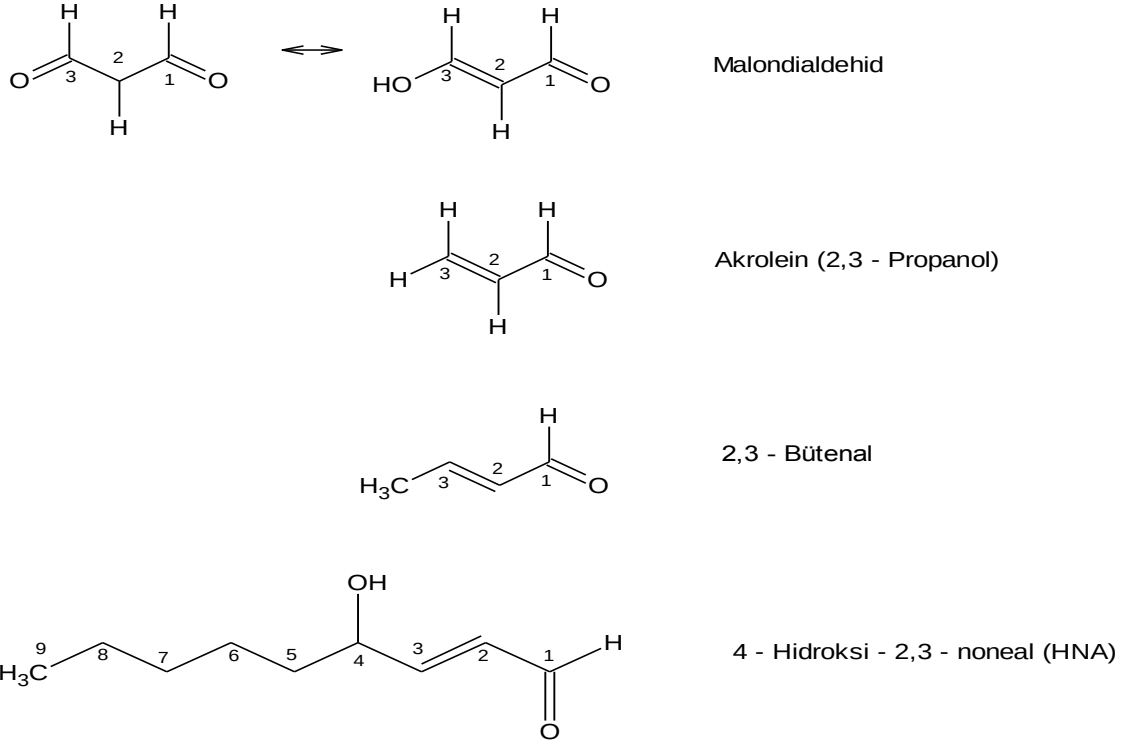
Reaktif oksijen türleri antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılmazsa lipit peroksidasyonu oluşturarak hücreye zarar verir [78].

Lipit peroksidasyonu, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyonun ifade eden kimyasal bir olaydır. Lipit peroksidasyonun artmış olması serbest radikalleri arttığının gösterir [44,80].

Hücre zarının yapısında lipit olduğu için, lipit peroksidasyonu hücre zarına zarar verir. Membran zar yapısı ve fonksiyonları bozular. Lipit peroksidasyonu sonucu hücre zarının akışkanlığı, geçirgenliği bozular. Membranda oluşan hasar geri dönüşümsüzdür [78,81].

MDA (malondialdehit), biyolojik sistemde lipitlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücresel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur [74]. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler [64].

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder (Şekil 1.9.).



Şekil 1.11. Linoleik asidin $\text{OH}\cdot$ radikalının bulunduğu ortamda lipid peroksidasyona uğraması ve son ürün olarak farklı aldehid moleküllerinin oluşması

MDA'nın artması, lipid peroksidasyonunun arttığını gösteren bir belirteç olmakla birlikte çeşitli rahatsızlıkların ortaya çıktığını haber veren bir işaretçi niteliğindedir. Örneğin; Etil alkol ve sigara dumanına maruz kalınmasının böbreklere yaptığı etkinin araştırıldığı bir çalışmada kontrol grubu, etanol grubu, etanol ve sigara kullanılan grup, sigara kullanan grup olmak üzere 4 gruba ayrılmış olup, MDA seviyesi, kontrol grubuna göre 3 grupta yüksek bulunmuştur [82].

1.6.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu koruyucu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevleri yapan maddelere genel olarak **antioksidanlar** denir. Diğer bir ifadeyle, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların organizmada oluşturduğu hasarı önlemek için vücutta şekillenen savunma mekanizmalarına **antioksidanlar** veya **antioksidan savunma sistemleri** denir [83-84].

Bir şekilde oluşturulan herhangi bir ilk radikal ürünün reaktif karakterine bağlı olarak biyomoleküller ve hücresel yapılara saldırmasının önlenmesi antioksidan savunma sisteminin işidir [62].

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidan adı verilmektedir.

Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirmektedir:

- Toplayıcı etki,
- Bastırıcı etki,
- Zincir kırıcı etki,
- Onarıcı etki

Zincir kırma reaksiyonlarının her basamağında kesinlikle az da olsa hidroperoksit oluşması, ortamdaki ürünler ve haraplanmanın sıfırlanamaması nedeniyle oksidasyon reaksiyonları ve radikaller tamamen yok edilemez [63,85].

Antioksidan maddeler, organizmanın oksidan-antioksidan dengesini korumada rol oynayan beş mekanizmanın en az biri üzerinden etkilidirler. Bu mekanizmalar lipid, protein ve DNA moleküllerinde oluşan hasarın onarılması; oluşan serbest radikallerin etki alanlarından toplanarak temizlenmesi; hücresel kinaz kayıplarının önlenmesi; serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonların durdurulması ya da reaksiyon hızının baskılanması; organizmada SOD gibi endojen antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezinin artırılması şeklinde sıralanabilir [63, 86-87].

Bazı otörler, antioksidan savunmayı, komponentlerin enzimsel olup olmasına bakarak, katalaz, SOD ve GSH-Px'ın rol aldığı antioksidan aktiviteleri “enzimatik antioksidan savunma”, glutatyon, ürik asit, glikoz, tokoferol, askorbat gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini “nonenzimatik savunma” olarak tanımlar [62].

Hücrel homeostatik dengenin korunması, organizmanın canlı ve sağlıklı kalabilmesi için gereklidir. Normal fizyolojik şartlarda iç ve dış kaynaklı stresörler hücrel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Bu stresörlere karşı korunma, antioksidan savunma olarak adlandırılan komponentlerle gerçekleştirilmektedir. Bu işlemler, yok edici enzimler ve membran nötralizanı gibi bir çok faktörün harekete geçirilmesi ve spesifik savunma komponentlerinin fonksiyonel integrasyonunu içermekte ve komponentler

hücrel iç karışıklıkları yok edip ya da azaltıp eksternal ve internal stresörlerin etkilerini yok ederek hücrenin uygun formda kalması için çalışmaktadırlar [63].

Reaktif oksijen ortamlar ve oksijen metabolizması ürünleri olarak üretilen reaktif türler, selüler homeostasis için başlıca tehdit olarak sayılabilir. Bu reaktif ürünler hücre için olmazsa olmaz temel fizyolojik ve metabolik işlemlerde üretilmektedir [88].

Serbest radikal üretimindeki artış, hücrel komponentler ve fonksiyonlara toksik etkili görülmektedir. Antioksidan sistemi oluşturan maddelerin görevi bu toksik etkilere karşı organizmayı ve reaktif moleküllerin oksidatif yıpratmasına karşı hücrel homeostasisi korumaktır [89].

Koruma işlemi; toksik etkili oksidan metabolit üretiminin engellenmesi, sekonder oksidan üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması, ortamdaki radikallerin temizlenmesi, endojen antioksidan kapasitenin artırılması ve inflamatuvar mediatörlerin blokajı gibi yollarla oluşturmaktadır [88,90].

1.7. Antoksidanların Sınıflandırması

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir:

1. Yapılarına göre:

- a. Enzimsel
- b. Enzim olmayan proteinler

2. Kaynaklarına göre:

- a. Organizmaya ait olanlar (Endojen) (SOD, Katalaz, α tokoferol)
- b. Dışardan alınanlar (Ekzojen) (Adenozin, Allopurinol, Glutasyon)

3. Çözünürlüklerine göre:

- a. Suda çözünenler (Glutasyon, Vit C, Ürik asit, Glukoz, Sistein)
- b. Lipitlerde çözünenler (Vit E, β -karoten, Bilirubin, Flavonidler)

4. Yerleşimlerine göre:

- a. İntraselüler olanlar (SOD, Katalaz, Glutasyon peroksidaz)
- b. Ekstraselüler olanlar (Askorbik asit, Transferin, Albumin)

Günlük yaşamın rutin ilerleyişi sırasında karşılaşılan oksidatif stres faktörlerinin giderilmesi ve fizyolojik işleyişin devamında endojen olarak bilinen antioksidanlar önemlidir. Hücrel enzimler ve nonenzimatik yapılardan oluşan endojen antioksidanlar ve özellikleri Tablo 1.3' de listelenmiştir [62, 91].

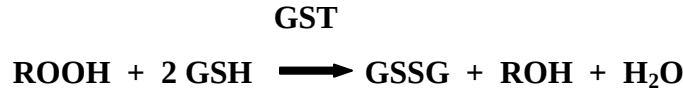
1.7.1.Endojen Antioksidanlar

1.7.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Hücrede, hücresel karışıklıkları azaltıp, oksidatif strese neden olan etmenlerin etkilerini yok ederek hücrenin en uygun koşullarında kalması için uğraşan antioksidan enzim sistemler mevcuttur. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon-S-Transferaz (GST), Süperoksit Dismütaz (SOD), Sitokrom Oksidaz ve Katalaz (CAT), lipid peroksidasyonunu ve toksik oksijen radikallerini etkisiz hale getirebilen en önemli antioksidan savunma sistemleri arasındadır [44,83, 92].

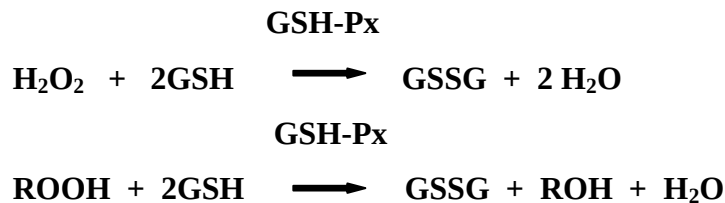
1.7.1.1.1. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonunda önemli rol alan bir enzimdir. GST'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. GST'lar temel olarak ksenobiyotik bileşiklerin, ilaçların, karsinojenlerin, pestisit ve herbisit gibi çevre kirleticilerin yer aldığı grupların detoksifikasyonunda rol oynarlar [44].



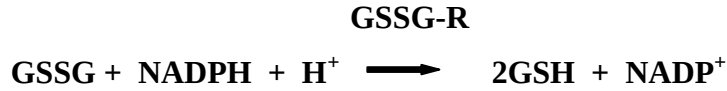
1.7.1.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan ve yağ asidi peroksitlerinin alkollere dönüşümünü katalize eden enzimdir. GSH-Px'in bu etkisiyle hücresel ve subsellüler membranların oksidatif etkiden korunmasını sağladığı belirtilmiştir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizlemektedir [44,93].



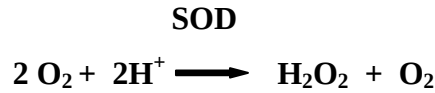
1.7.1.1.3. Glutatyon Redüktaz (GSSG-R)

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutatyon (GSSG), GSSG-R'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır [44].

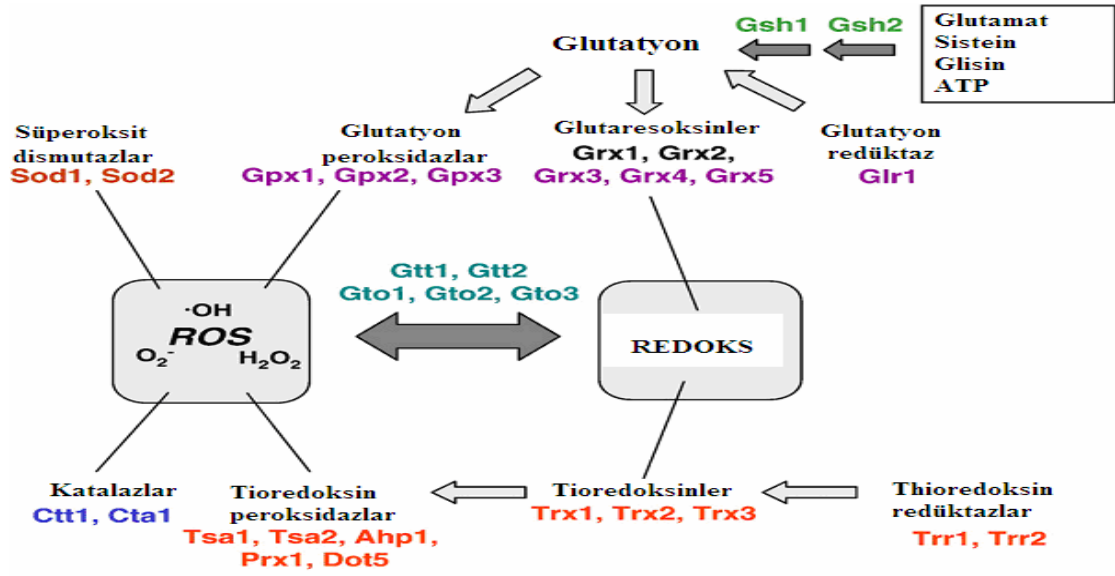


1.7.1.1.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Bu enzim, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder.



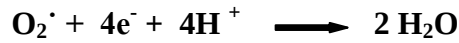
Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder [44]. *Saccharomyces cerevisiae*'de diğer ökaryotlar gibi süperoksit radikalini etkisiz hale getiren iki süperoksit dismutaz enzimine sahiptir (Şekil 1.12.) Bunlardan ilki, total SOD aktivitesinin %5-15'ini oluşturan SOD2 geni tarafından kodlanan Mn-SOD'dur ve bu enzim mitokondride süperoksit radikalini etkisiz hale getirir. İkincisi ise, toplam SOD aktivitesinin %90'ını oluşturan ve SOD1 geni tarafından kodlanan Cu,Zn-SOD'dur. Bu enzimin kompleks yapılı ökaryotik hücrelere ilaveten farklı maya türlerinin mitokondriyal intermembran boşluklarında bulunur ve Cu, Zn-SOD mayada oksidasyona karşı mitokondriyal ve sitosolik yapıları korur [39]. Bu enzimin *Saccharomyces cerevisiae*'deki sentezinin mayanın geliştiği ortam şartlarına bağlı olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir.



Şekil 1.12. Reaktif oksijen türlerinin etkilerine karşı *Saccharomyces cerevisiae*'de gerçekleşen antioksidan savunma mekanizmaları ve redoks tepkimeleri

1.7.1.1.5. Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin bir enzimi olup, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eder.

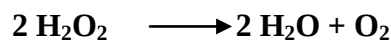


Fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden bu reaksiyonda süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek peroksinin zararlı etkilerine engel olurlar [44].

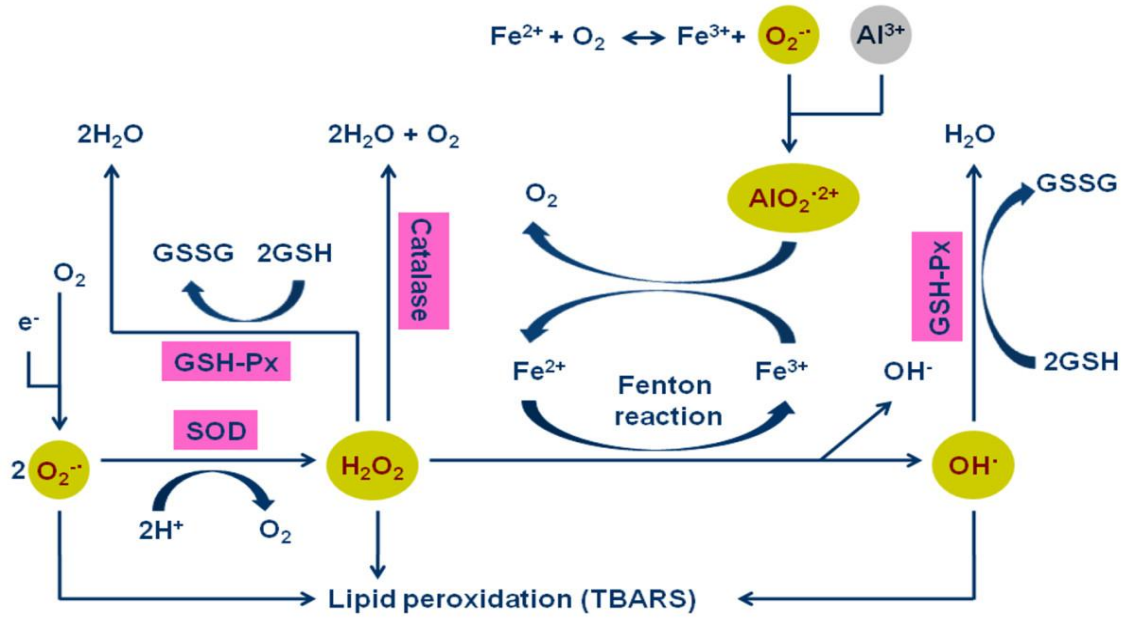
1.7.1.1.6. Katalaz (CAT)

Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, hücreler için zararlı olan hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalamaktır.

CAT



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı olup, büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez [44].



Şekil 1.13. Lipid peroksidasyonu ve katalaz'ın etki mekanizması

1.7.1.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

1.7.1.2. 1. Lipit Fazda Bulunanlar

1.7.1.2.1.1. E Vitamini

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Bishop tarafından 1923 yılında tanımlanmış ve daha sonra kimyasal yapısı aydınlatılmıştır [96].

Tokoferol kelimesi tokos: doğurma ve phero: taşımak anlamlarına gelen sözcüklerden kurulmuştur. Alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli doğal tokoferoller bulunmaktadır. α -tokoferol, tokoferoller içinde en aktif olanıdır. Isıya dayanıklıdır, dondurma ve kızartma ile önemli ölçüde tahrip olur [98]. E vitamini, plazma ve tüm hücrel membranlarda bulunan bir lipit-faz antioksidanıdır [94].

Hücrede süperoksitlerin, çoklu doymamış yağ asitlerini okside ederek, onları nonenzimatik olarak harap etmesini önler. En önemli kaynak bitkisel yağlar ve tohumlardır. Ortalama diyetle günde 5-10 mg kadar E vitamini alınmaktadır. Doğada ve besinlerde oldukça yaygın olarak bulunduğu için insanda eksikliği nadir olarak gösterilmiştir. Prematüre bebeklerde E vitamini eksikliğine bağlı hemolitik anemi

gösterilmiştir. Emilebilmesi için yağ emilimi ve safra asitlerinin normal olması gerekir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif difüzyonla emilir. E vitamini en fazla LDL'de (low density lipoprotein) bulunur. Bir LDL partikülünde ortalama 6 tane α -tokoferol molekülü vardır [95-96]. Plazma konsantrasyonu 0,4-0,5 mg/dl kadardır [97].

E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Yapısında bulunan fenolik hidroksi grubuna sahip aromatik halka, molekülün kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Lipit peroksi radikalini ($ROO^{\bullet}$) parçalayarak lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırır.



Oluşan tokoferoksil radikali glukuronik asitle konjuge edilerek safra yoluyla atılır. E vitamini okside olduktan sonra askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. E vitamininin emilimi için selenyum gereklidir. E vitamini ise selenyumun kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.

1.7.1.2.1.2. Karotenoidler ve Retinol

Bitkilerde karotenoidler, hayvansal besinlerde ise retinol esteri halinde bulunur. Isıya dayanıksızdır. Et, balık, karaciğer gibi hayvansal besinlerde, havuç, domates ve yeşil yapraklı sebzelerde bol bulunur. Retinol barsaktan tamamıyla absorbe edilirken, karotenlerin yaklaşık 1/3 kadarı absorbe edilir [98].

A vitamininin metaboliik ön maddesi olan (3-karotenin singlet oksijeni baskılama, superoksit radikalini temizleme özelliklerine ek olarak peroksil radikali ile etkileşerek antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir [99].

Böylece E vitamini ile birlikte hücre membranını lipit peroksidasyon zincir reaksiyonundan korur. Ayrıca antikanserojen ve antiaterosklerotik olduğu da gösterilmiştir [100-101].

1.7.1.2.1.3. Ubikinon

Yağda eriyen, izoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Redükte formu koenzim Q'dur. Lipoproteinlerde relatif olarak düşük konsantrasyonlarda bulunur. Olasılıkla tokoferol

radikalinden, tokoferolü rejenere etmekte ve antioksidan etkinliğini artırmaktadır. Ayrıca membran fosfolipitlerini oksidatif hasardan koruduğu ve singlet oksijeni temizlediği düşünülmektedir [102].

1.7.1.2.1.4. Biluribin

Katabolik son üründür. Ankonjuge biluribin dolaşımında albümine bağlanır. Albümine bağlı yağ asitlerini lipit peroksidasyonuna karşı korur [101].

1.7.1.2.1.5. Melatonin

OH[•] radikallerini ortamdan uzaklaştıran lipofilik ve güçlü bir antioksidandır. Melatoninin hidroksil radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü ve bu radikalın süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir [103]. Tüm hücre organellerine ve nükleusa ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. DNA'yı oksidatif hasardan koruması açısından önemlidir.

1.7.1.2.2. Sıvı Fazda Bulunan Antioksidanlar

1.7.1.2.2.1. C Vitamini (Askorbik Asit)

Suda eriyen güçlü bir antioksidandır. İnce bağırsaklardan kolaylıkla emilir. Plazma konsantrasyonu 2 mg/dl'dir. Yüksek dozların daha düşük dozlara üstünlüğü belli olmadığından 100-500 mg/gün dozunda alımı yeterli görülmektedir [35].

Isı, ışık, bakır varlığı özellikle alkali ortamda kolaylıkla okside olmasına yol açar. C vitamininin ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı ve kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır [91].

Süperoksit ve hidroksi radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları ortamdan uzaklaştırır. Tokoferoksil radikalinin, α -tokoferole redüklenmesini sağlar [35-37].

Reaktif bakterisidal moleküllerin hücre içi düzeylerinde azalmaya yol açmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller. *In vivo* olarak glutatyon, askorbatın indirgenmiş durumunu sürdürmek için gereklidir. Bu mekanizma, glutatyon redüktazın etkinliğine bağlıdır.

Diğer bir özelliği ferri demiri, ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajan olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı, prooksidan olarak da değerlendirilir.

Bunların dışında oksidasyonu ile direkt H_2O_2 meydana gelebilir. Diyetle C vitamini alımının akut sigara içimi ile oluşan LDL oksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Diğer antioksidanlar gibi C vitamininin de antikanserojen etkisi gösterilmiştir [104-105].

1.7.1.2.2.2. Ürik Asit

Normal plazma konsantrasyonunda hidroksil, süperoksit, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Bakır ve demir iyonlarıyla oluşan oksidasyona karşı şelat yaparak C vitaminini oksidasyona karşı korur [100]. Hemoglobin ve eritrositleri peroksidatif hasardan korur [44].

1.7.1.2.2.3. Seruloplazmin

Bakır içeren bir proteindir ve plazmada bakırın %90 kadarını taşır. Ferrooksidaz aktivitesi dolayısıyla önemli bir antioksidandır. Oksijen suya redüklenirken, Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e oksidasyonunu katalizler. Bu transferline demir bağlanmasını artırır ve Fe^{+2} 'nin H_2O_2 ile reaksiyonunu önler [106].

1.7.1.2.2.4. Transferrin

Vücutta demir taşıyan başlıca proteindir. Bağlı demir, $OH^{\bullet}$ oluşumu veya lipid peroksidasyonunda rol alamamaktadır [101].

1.7.1.2.2.5. Ferritin

Dokuda demir bağlayan bir proteindir.

1.7.1.2.2.6. Albümin

Bakır bağlama kapasitesi düşüktür. Redoks kapasitesi düşüktür ve lokal hasar oluşturabilir. Yüksek konsantrasyonu ve yüksek turnoveri nedeniyle hasarın biyolojik sonuçları sınırlıdır. Plazmanın zincir kırıcı antioksidan aktivitesine yol açan plazma sülfidril gruplarının majör komponentidir. Plazmada hipokloröz asitin güçlü bir temizleyicisidir [101].

1.7.1.2.2.7. Glutasyon

Glutamik asid, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmuştur. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. -SH gruplarını redükte halde tutarak, fonksiyonel protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.

1.7.1.2.2.8. Haptoglobulin-Hemopeksin

Hem bileşikleri lipit peroksidasyonunu hızlandırmaktadır [94,107]. Bu durumda hemopeksin hemi, haptoglobulin hemoglobini bağlayarak lipit peroksidasyonunu uyaran bu bileşiklerin etkinliğini azaltırlar [101,108].

1.7.2. Eksojen Antioksidanlar

1.7.2.1. Allopürinol – Oksipürinol

Ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla süperoksit oluşumunu inhibe eder. Ayrıca serbest radikal temizleme kapasitesine de sahiptir.

1.7.2.2. NADPH-Oksidaz inhibitörleri

Nötrofil ve makrofajlarda mevcut NADPH-Oksidaz aracılığıyla süperoksit oluşumunu inhibe eder. Adenozin, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, lokal anestezikler ve bazı kalsiyum antagonistleri örnek verilebilir [106].

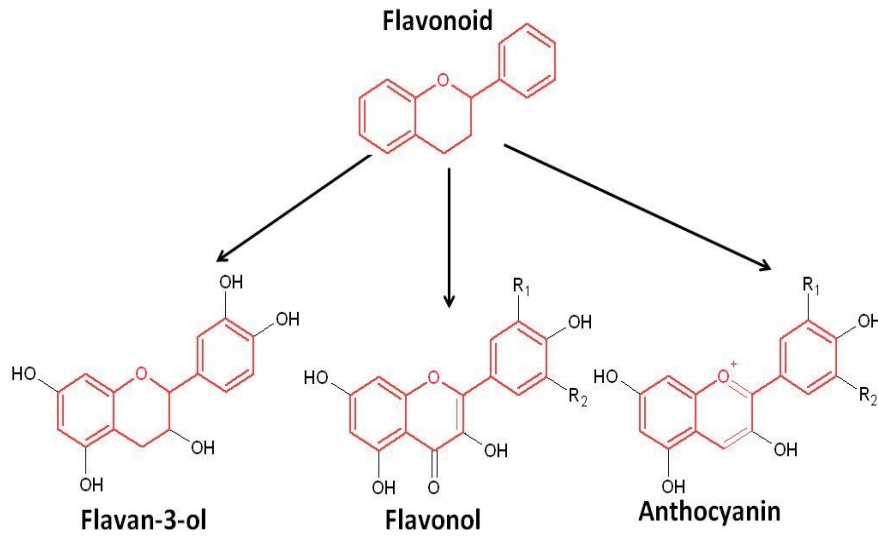
1.7.2.3. Tiyoller

Plazma proteinleri, özellikle de albüminle taşınır. Tüm plazmaya oksidatif stres uygulandığında hemen okside olur. Glutasyon membranlar kolayca geçemez, ancak asetil sistein gibi tiollerin uygulanmasıyla rejenere olur.

1.7.2.4. Flavonoidler

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin, $O^{\bullet-}$, $RO^{\bullet}$ ve $ROO^{\bullet}$, NO radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α - tokoferol rejenerasyonu gibi etkileri söz konusudur [109]. Fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla antiinflamatuvar özellik gösterirler [110-111]. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi

konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Görevi $ROO^{\bullet}$ ve $RO^{\bullet}$ radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Flavonoidlerin, bakır iyonlarıyla kompleks oluşturma kabiliyeti gösterilmiştir. Bu kompleks oluşumu, antioksidan etkilerine bağlanabilir. Metal iyon şelasyonu katalitik olarak inaktivasyon sağlar [112-113].



Şekil 1.14. Flavonoidler

Flavonoidler, fenolik bileşikler içinde en önemli grubu oluşturan flavan (2fenolbenzodihidropiran) türevleridir. Yapısal olarak altı gruba ayrılırlar:

- antosiyanidinler,
- flavonoller,
- flavonlar
- flavanonlar,
- kateşinler (flavanoller),
- izoflavonoidler.

Tablo 1.3. Başlıca ekzojen antioksidanlar ve özellikleri [62,114].

Antioksidan sınıfı	Spesifik tipi	İşlevi
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
	Oksipurinol	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
	Pterin aldehit	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
	Tungsten	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
Proteaz inhibitörleri	Soya tripsin inhibitörü	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
	Serin proteaz inhibitörleri	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
	Fenilmetilsülfonil (PMSF)	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
NADPH oksidaz inhibitörleri	Adenozin	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Lokal anestezikler	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Kalsiyum kanal blokerleri	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Nonsteroid antünflamatuvarlar	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Cetiedil	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
Süperoksit dismutaz	Doğal SOD	Süperokstten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	IgA bağımlı SOD	Süperokstten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	Polietilen glikol SOD	Süperokstten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	Ginkgo Biloba (Egb 761)	SOD ile benzer fonksiyon
Katalazlar	Doğal katalaz	H ₂ O ₂ 'nin oksijen ve suya indirgenmesi ve nötralizasyonu
	PEG-katalaz	H ₂ O ₂ 'nin oksijen ve suya indirgenmesi ve nötralizasyonu
	Lipzom kapsüllü katalaz	H ₂ O ₂ 'ni O ₂ ve H ₂ O'ya çevirir
Nonenzimatik toplayıcılar	Mannitol	Hidroksil radikal giderici
	Albumin	Geniş çaplı oksidan toplayıcı
	Dimetil sulfoksid	Fe, süperoksit, hidroksil toplayıcı
	17-aminosteroid lazaroidler	H ₂ O ₂ ve hidroksil giderici
	Glutasyon	Süperoksit giderici
	Ürik asit	Süperoksit ve hidroksil giderici
	Spin tuzakları	Tüm radikalleri toplar
	Bilirubin	Peroksidasyon zincirini bozar
Demir redoks zinciri inhibitörleri	Deferoksamin	Serbest Fe ³⁺ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
	Apotransferrin	Serbest Fe ³⁺ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
	Seruloplazmin	Serbest Fe ³⁺ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler

Tablo 1.4. Bilinen endojen antioksidanlar ve etkinlikleri [62,114].

Antioksidanlar	Yapısı	Yerleşimi	İşlevi
Stkrm oksdz	Tetramerik protein	Plazma	Süperoksit nötralizanı
SOD	Cu, Zn, Mn SOD	Mitokondri, serum,	Süperoksiti H ₂ O ₂ 'e çevirir
Katalaz	hemoprotein	Peroksizomlar	Peroksit nötralizanı
GSH-Px	Selenoprotein	Sitosol, mitokondri	L P ürünlerini indirger
GSH-redüktaz	Dimerik protein	Citool, mitokondri	Disülfidleri indirger
α -tokoferol	Yağda çözünen vit.	Membranlar,eks.sel. ortam	Peroksidasyonu azaltır
β -karoten	Vit A prekürsörü	Hücre membranları	Peroksil temizleyicisi
Glutasyon	Tripeptid	Intraselüler ortam, alveoller	GSH redoks substratı
Askorbik asit	Suda çözünen vit.	Hücre içi ve dışı sıvıları	Vit E'yi rejenere eder
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş bir dağılım gösterir	Hidroksil toplar, vit C korur
Sistein	Amino asit	Geniş bir dağılım gösterir	Organik bileşikleri indirger
Albumin	Protein	Plazma, serum	Serbest radikalleri giderir
Bilirubin	Hemoprotein ürünü	Dolaşım kanı, dokular	Zincir kırıcı antioksidan
Seruloplazmin	Protein	Dolaşım kanı, dokular	Süperoksiti H ₂ O ₂ 'e çevirir
Transferlin	Glikoprotein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Protein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Glikoprotein	Dolaşım kanı, dokular	Doku demiri bağlayıcısı

1.7.3. Oksidan-Antioksidan Dengenin Bozulması

Çevresel kimyasal maddelere maruz kalma, hücrelerde radikal oluşumu ve reaksiyonlarını arttırarak oksidatif strese yol açmaktadır [85-115]. Hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma, organik yanık madde alımı (yanmış gıdalar, sigara dumanı gibi) ve iyonize edici radyasyon başlıca ekzojen radikal kaynaklarıdır [85,115-117].

Örneğin, herbisitler, paraquat ve diquatın uygulandığı hayvanlarda, malondialdehit (MDA), etan, pentan gibi peroksidasyon ürünlerinin artması, bu maddelerin redoks devrine girerek süperoksit oluşturduğu ve lipid peroksidasyonunda rol aldığını göstermektedir [118].

Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres”, sonuçta bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkımlanma ve doku hasarını getirir [34,119-120].

Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasından endojen faktör olarak mitokondrial oksijen hareketleri sorumludur [79].

Organizmaya ani ve aşırı miktarda oksijen girişi, nonilfenol gibi kimyasal çevre kirleticilerinin yoğun olduğu ortamlardan uzun süre etkilenim, yoğun stres, sigara ve alkol kullanımı, laktik asit, laktat dehidrogenaz, diyetle doymamış ve kolay peroksitlenebilen yağların fazla miktarda bulunması, kreatin fosfokinaz gibi litik enzim aktivitelerinin yükselmesi; epinefrin ve diğer katekolaminlerin artışı, egzersiz, gebelik, yaşlılık gibi fizyolojik haller, antioksidan savunma sistemi yetmezlikleri veya savunma duvarının aşılması gibi durumlarda hassas olan oksidan-antioksidan denge, oksidanlar lehinde bozulabilir. Bu olgu serbest radikallerin oluşumunun artışından ya da antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden ileri gelebilir [91,121].

Yaşadığımız atmosferdeki elektromanyetik alanlar, ozon ve kısmi oksijen basıncı, UV, X ve güneş ışınları gibi faktörlerle de oksidan-antioksidan dengenin radikaller lehine bozulabileceği gösterilmiştir [122-123].

Birçok hastalık ve patolojik olgular da oksidanantioksidan dengeyi olumsuz etkilemektedir [79,124]. Ancak tüm araştırmacıların birleştikleri konu herhangi bir nedenle oksidan-antioksidan dengenin bozulmasıyla oluşan radikallerin öncelikle zar lipidleri olmak üzere proteinler ve DNA gibi tüm biyomoleküller için bir risk faktörü oluşturduğudur [85].

Oksidan-antioksidan dengenin radikaller lehine bozulması bir dizi zincirleme reaksiyonlarla mümkündür. Söz konusu zincirleme reaksiyonları başlatmak, serbest radikallerin radikal olmayan maddelerle yeni radikaller oluşturmak üzere girdikleri reaksiyon tipleri Tablo 1.5’de gösterilmiştir [89].

İnterselüler antioksidan enzimlerin artışı, bilirubin, transferrin, glikoz, ürik asit ve albumin gibi ekstraselüler antioksidan düzeylerinin yükselmesi, hipervitaminozis gibi olgularda oksidan-antioksidan denge antioksidanlar lehine bozulmakta ve gerçekte bir “antioksidatif stres” tablosu oluşmaktadır [85,107]. Vücut çok hassas bir oksidan-antioksidan dengeye sahiptir. Bir antioksidanın düzensiz dozlarda alınımı bu dengeyi bozarak olumsuz etkiler oluşturabilir.

Antioksidatif stres kavramı aşırı ve düzensiz antioksidan kullanımında ortaya çıkmaktadır. Tehlikeli olan bu radikallerin aşırı artışıdır. Bu zararın giderilmesi amacıyla kullanılan antioksidan maddeler sanıldığı kadar saf değildir [126].

Herbert [127], vitamin C ve β karotenin psikolojik seviyelerde antioksidan olarak davrandığını fakat farmakolojik seviyelerde de prooksidan etkilerinin arttığını vurgulamıştır.

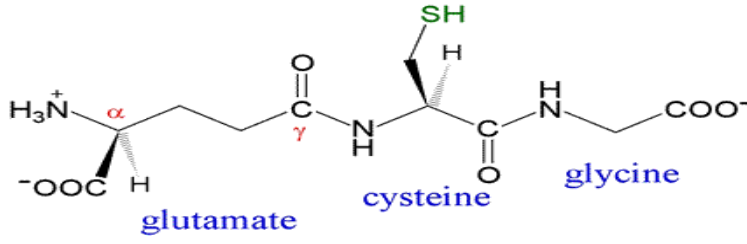
Antioksidan kullanımında önemli olan, bir antioksidanın prooksidan olabileceğini de bilmektir [89,128].

Tablo 1.5. Serbest radikallerin radikal olmayanlarla başka radikaller oluşturmak üzere girebilecekleri reaksiyonlar ve bazı örnekler [89].

Reaksiyon Tipi	Genel Gösterim	Örnek
Eklenme	$x + y \rightarrow [x-y]$	DNA guaninine OH^- eklenmesiyle 8-hidroksiguanin radikali oluşması
İndirgeme (radikalin elektron vermesi)	$x + y \rightarrow y^- + x^+$	Paraquat radikalının O_2 'ni süperoksit radikaline indirgemesi
Yükseltgeme(radikalin elektron alması)	$x + y \rightarrow x^- + y^+$	$O_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow$ askorbat + H_2O_2 askorbik asitin gösterimindeki gibi yükseltgenmesi
Yükseltgenme (radikalin H atomu alması)	$x + y-H \rightarrow x-H + y$	Lipit peroksil radikali ile α -tokferolün reaksiyonu $\alpha TH + LOO \rightarrow LOOH + \alpha T$

1.8. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (g-glutamil sistein glisin) organizmada tiyol grubu içeren düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. Yapısını oluşturan 3 aminoasit sırasıyla glutamik asit+sistein+glisin'dir [128-129]. Dokularda yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında önemli rol oynayan glutasyon, gliseraldehit fosfat dehidrogenaz enziminin prostetik grubudur. Glutasyon dokularda oksijen taşınmasında rol oynayan gliksilaz adındaki koenzimde bulunan bir tripeptittir.



Şekil 1.15. Glutatyon'un (GSH) yapısı

Glutatyon kolaylıkla hidrojen verebilen ve alabilen bir yapıya sahiptir. Bu özelliği ile çeşitli redoks olaylarına katkıda bulunur. Bazı enzim sistemlerinin içinde yer alır, ayrıca eritrositlerde hemoglobinin dönüşümsüz oksidasyonunu engeller ve bağırsaklardan demir emilimini kontrol eder [131].

Glutatyonun DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı transport gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında önemli rolü vardır [128-132]. Glutatyon GSH-Px enziminin kofaktörüdür [129, 133].

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin kofaktörlüğünü yaparak, H_2O_2 'i; H_2O ve O_2 'ye çevirme tepkimesini metabolize eder [128-133].

DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır [128-133].

İndirgenmiş glutatyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli stres modellerinin reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir [134-135].

ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. *In vivo* ve *in vitro* yapılan deneylerde, endojen GSH'ın çeşitli hasarlarda mide mukozası bütünlüğünün korunmasında önemli bir mediatör olabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Diğer yandan stres ülserine bağlı iskeminin, hasara karşı savunmada önemli bir faktör olan mukozal enerji metabolizmasını azalttığı da gösterilmiştir [136-137].

1.8.1. Glutasyon Sentezi ve Döngüsü

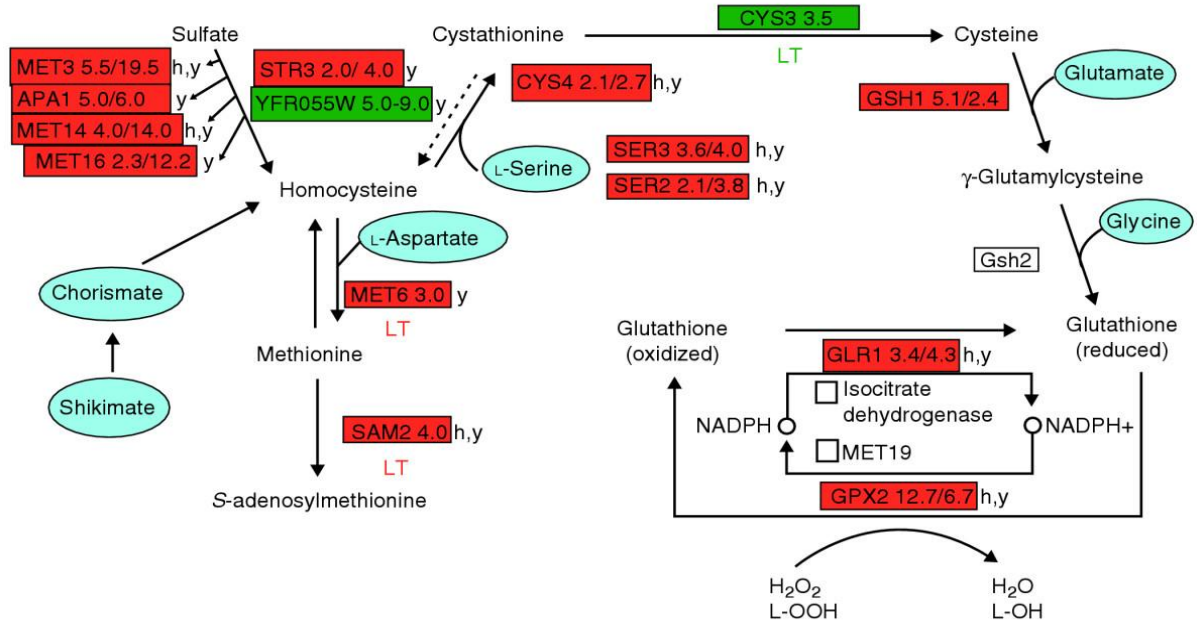
GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0,5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör (ana maddeyi oluşturan öncü madde) amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutasyon sentetaz, glisin ve γ glutamil-sisteinden glutasyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir [138-139].

GSH sürekli olarak hücreler tarafından kullanıldığından, sentezinin inhibisyonu hızlı tükenmesine yol açabilir [132-133]. Oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türleri (reactive oxygen substance (ROS)) oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş formunun (GSH) oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır. GSH-Px'ın katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'ın enzim aktivitesi için esas olduğu açıktır. Okdidasyon sonucunda oluşan GSSG (Glutasyon disülfid) ise glutasyon radüktaz isimli enzim aracılığıyla ile geri dönen bir siklusla GSH'a rejenere olmaktadır [135, 138].

Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır [135, 139]. Ayrıca GSSG'nin kendisi de, proteinlerin sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyonlaşarak kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir [135,140].

Bu son olaya bağlı hücre içi GSSG birikiminin, ATP'ye bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı ile bertaraf edildiği bildirilmiştir [141].

Diğer taraftan gastrik mukozada glikojen depolarının az olduğu ve devamlı glikoz ihtiyacının karşılanması gerektiği bilinmektedir [142].



Şekil 1.16. Glutasyon döngüsü

1.8.2. GSH'in Biyokimyasal Önemi

Glutasyon, hidrojen alıp verebilme özelliğinden dolayı redoks olaylarında, çeşitli enzim sistemlerinde, eritrositlerde hemoglobinin dönüşümsüz oksitlenmesinde, DNA ve protein sentezinde çeşitli rollere sahiptir [132].

Glutasyon serbest radikallere karşı organizmayı koruyan endojen bir antioksidandır. Glutasyon (GSH) hücrelerdeki serbest radikaller ile tepkimeye girerek GSSG'ye dönüşür, böylece hücreyi serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korur. Hücrede çeşitli sebeplerle oluşan serbest radikaller arttığı zaman GSH konsantrasyonu azalırken GSSG konsantrasyonu artmaktadır. Bu nedenle hücrelerde GSH konsantrasyonu azalıp, GSSG konsantrasyonu arttığında çeşitli hastalıkların habercisi olabilmektedir [130].

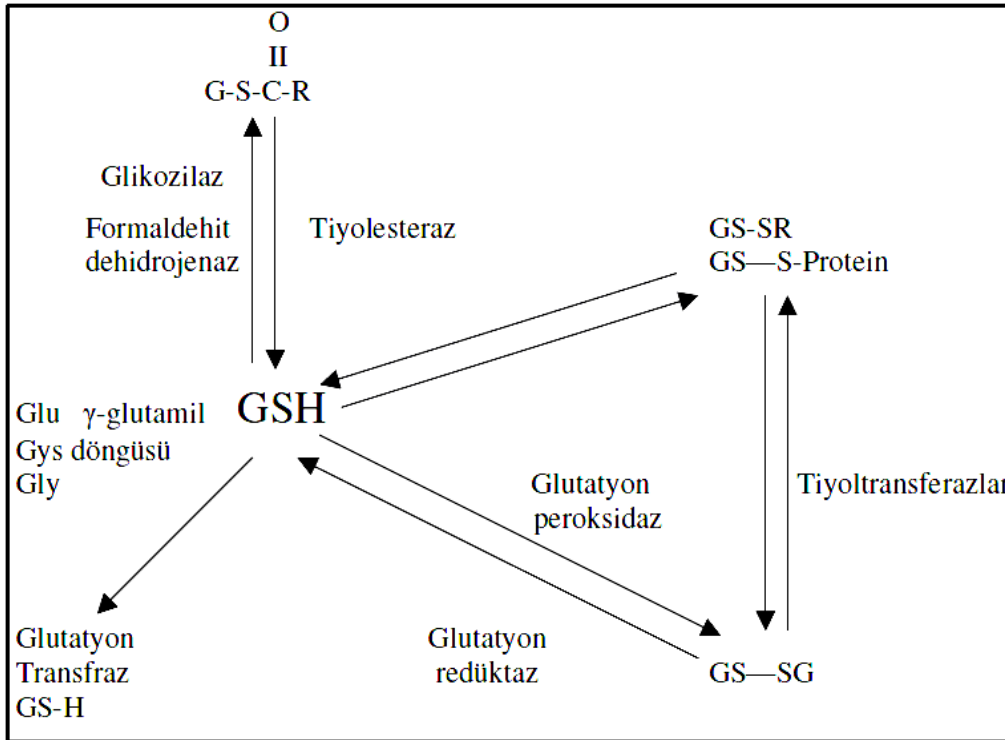
1.8.3. Glutasyonun Organizmadaki Biyolojik Görevleri

- Serbest radikal ve peroksitlerin yıkımı
- Proteinlerdeki –SH gruplarının korunması
- Organizmaya zararlı bileşiklerin detoksifikasyonu
- Aminoasitlerin membran transportunda yer alması
- Disülfit değişim reaksiyonlarına katılması
- Bazı enzimler için koenzim görevi yapması.

1.8.4. Glutatyona Bağlı Enzim Sistemleri

GSH, biyolojik materyallerde indirgenmiş sülfür kaynağı olarak bulunan bir bileşiktir. Bu nedenle oksijen metabolizması sırasında meydana gelen toksik ve reaktif bileşiklerin detoksifikasyonunda GSH ve GSH'a bağlı enzimlerin rolü büyük olup, Şekil 1.16'da olduğu gibi özetlenebilir. GSH'un canlı organizmada çok önemli ve kilit rolleri vardır [130].

Tiyol grupları hücre içerisinde daima indirgenmiş durumda bulunur. Sistein aminoasidi ve CoA'nın protein sentezi ve bir takım enzimatik reaksiyonlar için indirgenmiş durumda olmaları gerekir.



Sekil 1.17. Glutatyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri [78, 130]



Formaldehit dehidrogenaz ve glikozilaza gelince, bu enzimler reaktif aldehyitlerin inaktivasyonunu katalizlerler. Reaksiyon esnasında glutatyon tiyol grubu ile aldehyit arasında bir tiyohemiasetal türevi meydana gelir. Glutatyon türevi enzimatik reaksiyon ile bir tiyol estere dönüştürölür. Bu dönüştümde aldehyit grubunun yükseltgenmesi, karboksilik asit yükseltgenme düzeyine eşdeğerdir. Kinetik çalışmalarna göre glutatyon formaldehyit dehidrogenaz enziminin katalitik mekanizmasında esas aktivatör olarak görölmektedir [78].

1.8.5. Glutatyonun Tayin Yöntemleri

1.8.5.1. Spektrofotometrik Yöntem

Dokularda geniş bir dağılım gösteren ve bazı önemli biyolojik fonksiyonlara sahip GSH ve türevlerinin miktar tayini çalışmaları GSH'un ilk keşfedildiği yıllara dayanır. GSH indirgenmiş halde sülfüdril ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG) olarak da disülfid gruplarına sahip iki şekilde bulunur [145].

GSSG'nin miktar tayini GSH'a göre daha güçtür. Bunun nedeni de GSSG'nin normalde hücreler içerisinde ve düşük miktarlarda bulunuyor olmasıdır. GSSG'nin tayini genel olarak GSSG'nin kimyasal elektrolitik ve enzimatik olarak indirgenip GSH'a dönüştürölmesi ve oluşan GSH üzerinde saptanması esasına dayanır. Enzimatik indirgenme NADH veya NADPH tarafından maya glutatyon redüktazı varlığında oluşturulur. Daha sonra oluşan GSH, 2-nitro -5-tiyobenzoik asit ile kromoforik bir bileşik meydana getirir ve bu bileşiğin 412 nm'de spektrofotometrik olarak (ng) düzeyinde saptanması mümkündür [78,143].

1.8.5.2. HPLC Yöntemi

GSH, izokratik ters faz HPLC metodu ile tümör hücrelerinden sağlanan biyopsi materyalinde ölçölebilmıştır. Materyal sülfosalisilat çözeltisi ile ön işlemden geçirilir. GSH için konjugatlarını elde etmek amacıyla monobromobiman kullanılır ve florosans özellikli

GSH konjugatları ters faz oktadesilsilan kolonundan elde edilir. İzokratik koşullar asetonitril/amonyum fosfat tamponu tetrabutylamonyum hidroksit ile sağlanır [78,144].

1.8.5.3. Fluorometrik Yöntem

GSH ve GSSG'nin fluorometrik tayinini oftalaldehit gibi bir floresans bileşik kullanılarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde, GSH OPT ile pH: 8 ve GSSG OPT ile pH:12'de reaksiyona girer. GSH N-etilmaleimit ile kompleks meydana getirir. Bu durumda GSSG ölçümünde GSH'un girişimi engellenmiş olur. Bu yöntemde GSH ve GSSG için verim %91-100 oranındadır [78, 144, 145].

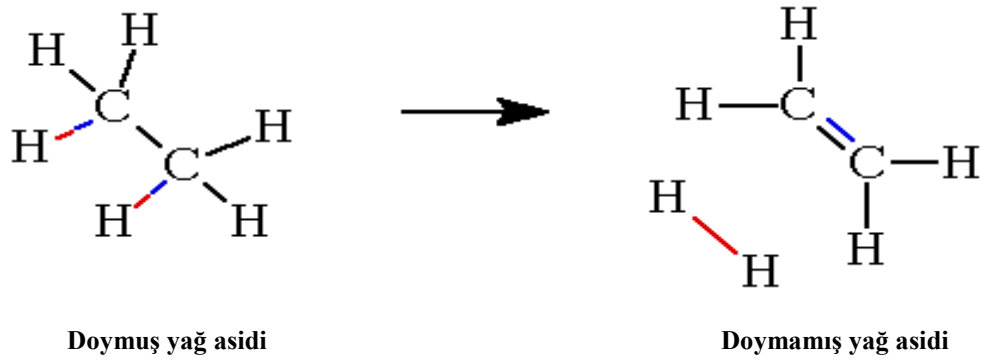
1.9. Yağ Asitleri

Yağ asitleri vücutta serbest (esterleşmemiş) veya triaçil gliserol gibi daha karmaşık moleküllerde yağ asit esterleri olarak bulunurlar. Serbest yağ asitleri küçük miktarlarda da olsa tüm dokularda bulunur. Yağ asitleri ayrıca glikolipitler, fosfolipitler, sfingolipitler, prostaglandinler ve kolesterol esterlerini içeren birçok bileşiğin öncül maddesidir. Bir yağ asidi, terminal karboksil grubu bulunan bir hidrokarbon zincirinden oluşur. Uç karboksil grubu COOH şeklinde iyonize olur. Anyonik grubun suya karşı ilgisi vardır. Bu ilgi yağ asidine amfipatik özellik kazandırır. Bununla birlikte uzun zincirli yağ asitlerinde hidrofobik kısım baskındır. Bu moleküller suda oldukça güçlü bir çözünmezlik özelliği gösterirler [146].

Yağ asitleri hücreye yapısal bütünlüğünü veren ve hücresel komponentleri ekillendiren hücre membranının temel bileşikleridir [146].

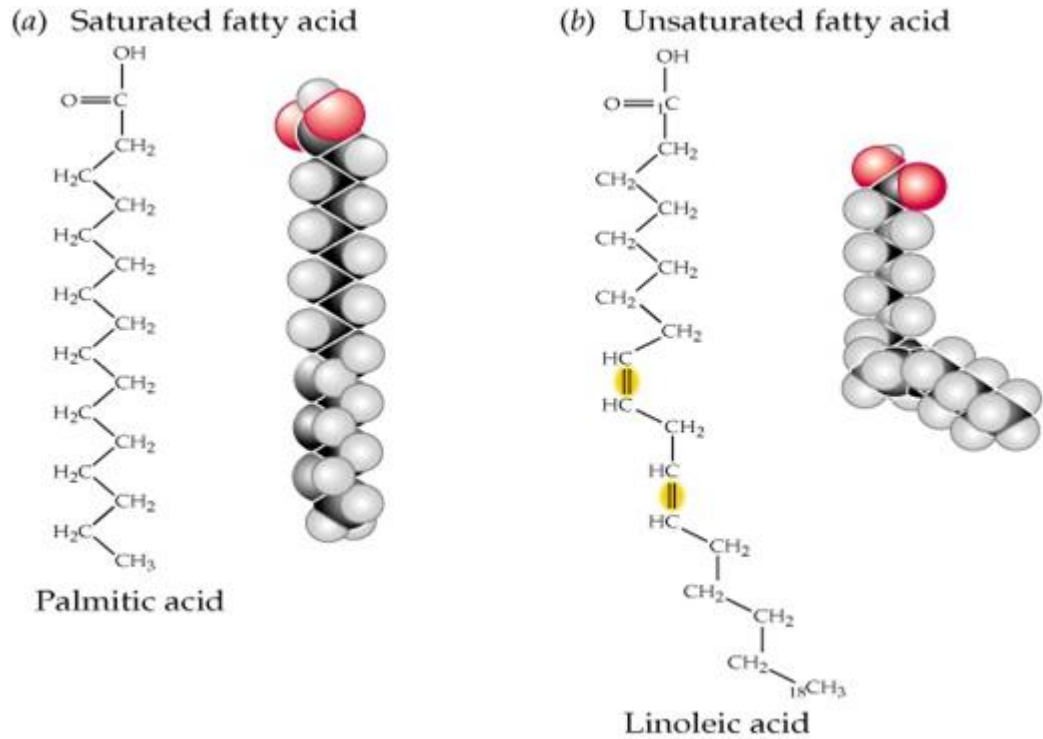
Yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini içerdikleri yağ asitlerinin kompozisyonu belirlemektedir [147].

Doğada kırktan fazla yağ asidi vardır. Yağ asitleri çift bağ içerip içermemelerine göre doymuş ve doymamış yağ asidi, insan vücudunda sentezlenip sentezlenememesine göre de elzem (esansiyel-temel) ve elzem olmayan yağ asitleri olarak sınıflandırılmaktadır. Yağ asidi zinciri çift bağ içermiyorsa doymuş (satüre), bir veya daha fazla çift bağ içeriyorsa doymamış (ansatüre) olduğundan söz edilir [148]. Doymamış yağ asitleri ise tekli doymamış (monoansatüre, tek çifte bağlı) ve çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitleri olarak ikiye ayrılırlar [149].



Şekil 1.18. Doymuş ve doymamış yağ asitleri

Zincirde çift bağların bulunması durumunda, bu bağlar trans konumundan ziyade hemen hemen daima cis konumunda bulunurlar. Bu çift bağın cis konumunda zincire girişi yağ asidinin burkulmasına neden olur [148].



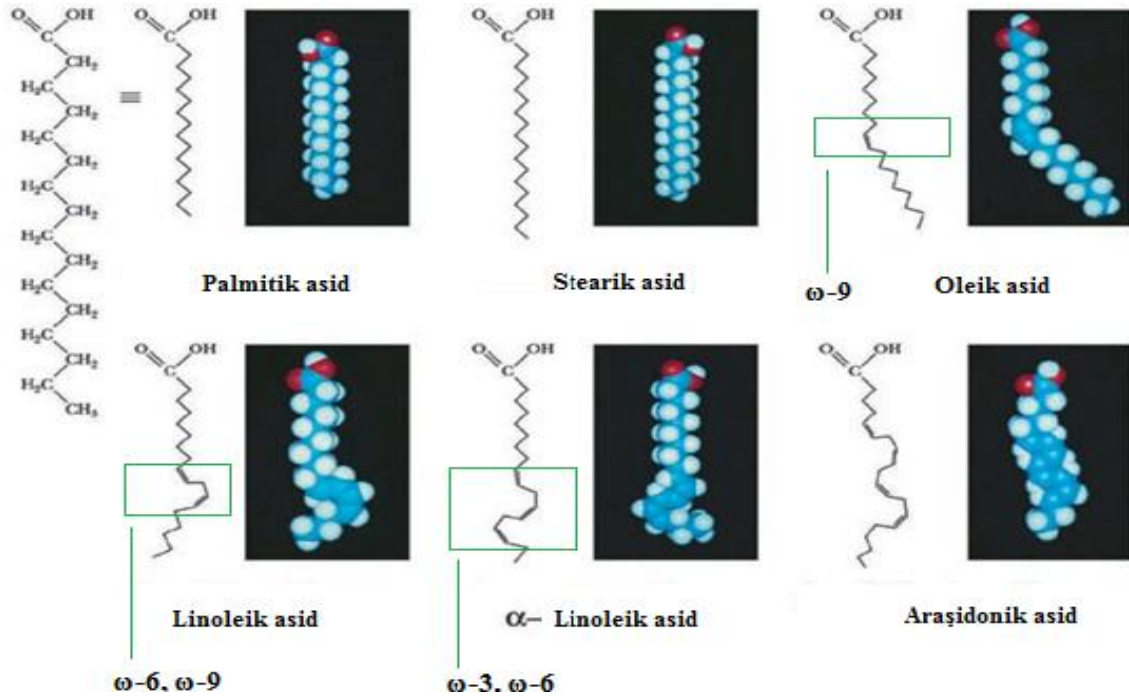
Şekil 1.19. Yağ asitleri [150].

Doymuş yağ asitleri içinde en genel olanları ise 16 karbonlu (C16) palmitik asit ve 18 karbonlu (C18) stearik asit ve de yine 18 karbonlu olan ve doymamış yağ asitlerinin bir

üyesi olan oleik asittir. Özellikle yüksek organizasyonlu bitkilerde ve düşük sıcaklıklarda yaşayan hayvanlarda, doymamış yağ asitlerinin miktarı doymuş yağ asitlerine oranla daha fazladır.

Serbest yağ asitlerinin dönüşümü çok hızlıdır ve dakikada plazmaya giren total kitlenin %20-40'i oksidasyon ve reesterifikasyonda kullanılır veya diğer yağ asitlerine dönüşür. Başlıca oksidasyon yerleri, dinlenme esnasında karaciğer ve kalp, egzersiz sırasında ise iskelet kasıdır ve oksitlenme oranı %20'den %60'a yükselir. Karaciğere gelen serbest yağ asitlerinin çoğu reesterifikasyona uğrayarak trigliseritleri oluştursa da linoleik asit gibi bazı yağ asitleri fosfolipit yapımında da kullanılır [151-152].

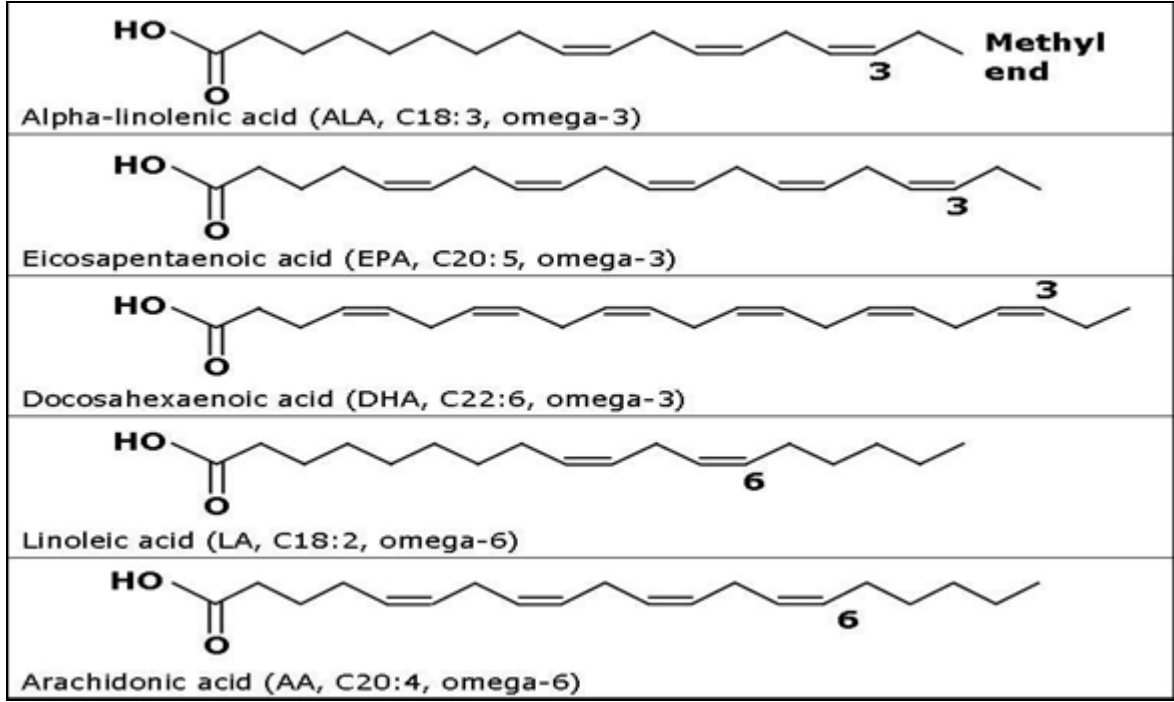
Laurik asit (C12:0), miristik asit (C14:0), palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), araşidik asit (C20:0) ve behenik asit (C22:0) bitkisel yağlarda bulunan en önemli doymuş yağ asitleridir. Özellikle palmitik ve stearik asit bitkisel yağlarda bulunan en yaygın doymuş yağ asitleridir [153]. Doymamış yağ asitleri, karbon zinciri üzerinde çeşitli konumlarda, karbonkarbon arasında bir veya daha fazla kovalent çift bağ içeren yağ asitleri doymamış yağ asitleri olarak isimlendirilir. Bu yağ asitlerince zengin olan yağlara da doymamış yağlar denir. Yapılarındaki çift bağlar nedeniyle, doymamış yağ asitleri doymuş yağ asitlerine göre daha reaktiftir. Bu reaktivite yağ asidi zincirindeki çift bağ sayısına göre artmaktadır [154]. Hidrokarbon zinciri ya palmitik asit de olduğu gibi doymuştur veya oleik asitte olduğu gibi bir veya birden fazla çift bağ ihtiva etmektedir. Yağ asitleri ya ihtiva ettikleri karbon zinciri uzunluğu veya ihtiva ettikleri çift bağ sayısı ile birbirinden ayrılmaktadır [155-156]. Yapılarında bir çift bağ içeren yağ asitleri tekli doymamış (MUFA, monounsaturated) yağ asitleri veya monoenoik yağ asitleri olarak isimlendirilir. Bu grubun en önemli iki üyesi, palmitoleik asit (C16:1) ile oleik asittir (C18:1). Bunlardan palmitoleik asit daha çok deniz hayvanları yağları için karakteristik bir bileşen olduğu halde, oleik asit bugüne değin bilinen bütün doğal yağların yapısında yer almıştır almıştır. Yapılarında, birden fazla çift bağ içeren yağ asitleri ise çoklu doymamış (PUFA, polyunsaturated) yağ asitleri olarak isimlendirilir. Linoleik (C18:2), linolenik (C18:3), arasidonik (C20:4) ve eikosapentaenoik (C22:5) asitler çoklu doymamış yağ asitlerinin en önemlileridir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin omega-3 ve omega-6 yağ asitleri olmak üzere iki ana grup vardır [157].



Şekil 1.20. Doymuş yağ asitleri

1.9.1. Omega-3 Yağ Asitleri

Omega-3 yağ asitleri 18-22 karbonlu uzun zincirli yağ asitleridir. İlk çift bağ 3. karbon atomundan sonra başladığı için bu seriden olan yağ asitleri omega-3 olarak adlandırılır. Karbon atomlarının sayısı arttıkça doymamışlık derecesi de artar. Omega-3 yağ asitlerinin en yaygın formu, eikosapentenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA; 22:6) ve bu iki yağ asidinin de kaynağı olan alfa-linolenik asittir (ALA;18:3). Keten tohumu, ceviz ve özellikle planktonlar ile yağlı balıklarda bol miktarda bulunur, keten tohumu ve cevizde alfa- linolenik asit, balık yağlarında ise EPA ve DHA en önemli yağ asitleridir. Balıklar temel olarak, insanlar tarafından tüketilen çoklu doymamış yağ asitlerinin tek kaynağıdır [158]. Çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) olan omega-3, kırmızı kan hücre zarlarının esnekliğini artırmaya yardımcı olur, böylece kan daha tortusuz ve akıcı olur. Bu beyni de içeren vücudun her yerinde dolaşan kanın daha sağlıklı bir şekilde sirkülasyonuna yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda sürekli kan pompalayan kalbin işini de kolaylaştırır.



Sekil 1.21. Omega-3 ve Omega-6 yağ asitleri

1.9.2. Omega-6 Yağ Asitleri

Omega-6 yağ asitlerinin en yaygın formu ise gama linoleik asittir. Diğer omega-6 yağ asidi olan araşidonik asit (ALA) GLA'dan sentezlenmektedir. Genellikle bitkisel kaynaklı bir yağ asididir. Omega-6'ların ana kaynağı linoleik asit içeren mısır ve soya fasülyesi yağıdır [159].

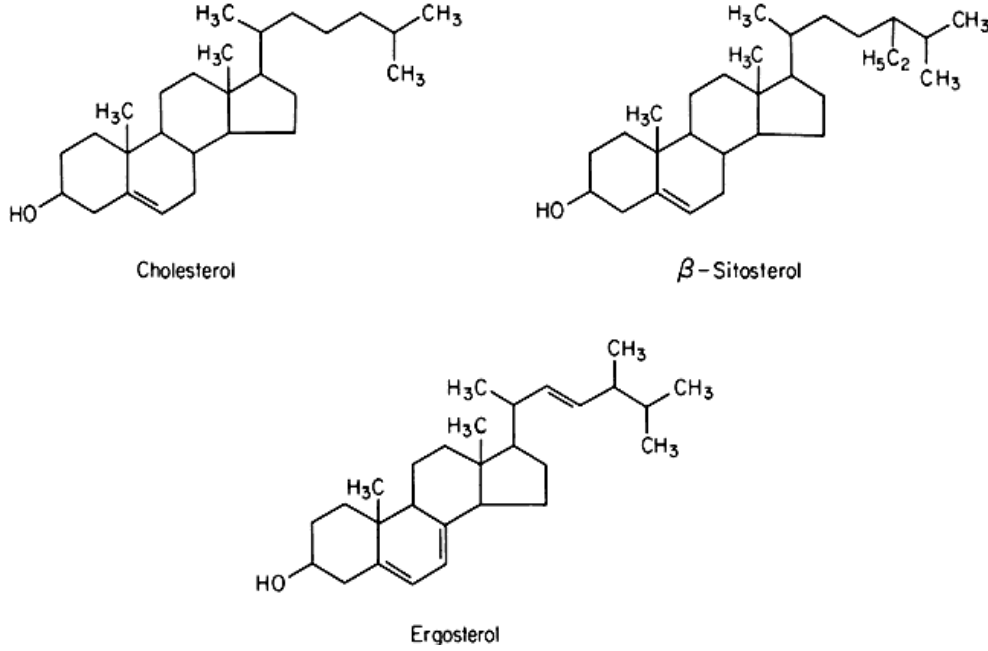
1.9.3. Steroidler

Steroidler, hayvansal ve bitkisel dokularda çok yaygın olarak bulunan maddelerdir. Bunlar steroller (sterinler), safra asitleri, cinsiyet hormonları, adrenal korteks hormonları ve D vitamini grubu olmak üzere beş grup altında toplanırlar [80].

Steroller, üç numaralı karbonda alkolik bir hidroksil grubu bulunan steroidlerdir;

- zoosteroller (kolesterol, lanesterol)
- mukosteroller (ergesterol) ve
- fitosteroller (stigmasterol sitosterol, kampesterol) olarak üç grup oluşturlar.

Mukosteroller, mantar ve mayalarda bulunan sterollerdir. Mukosterollerin en önemli üyesi, ergosteroldür (Şekil 1.20.) [160].



Şekil 1.22. Steroidler [161].

Lanosterol, özellikle koyunların yünlerinde bol miktarda bulunan lipitlerden elde edilmektedir [80].

Fitosteroller, bitkisel kaynaklı sterollerdir. Fitosterollerin en önemli üç üyesi, stigmasterol, sitosterol ve kampesteroldür.

Stigmasterol, özellikle soya fasulyesinde bol miktarda bulunur; bu maddenin progesteron hormonuna çevrildiği laboratuvar deneyleriyle gösterilmiştir. Sitosterol özellikle tahıl tanelerinde bol miktarda bulunmaktadır.

1.10. Vitaminler

Vitaminler organizmadaki biyokimyasal reaksiyonların hızlı ve düzenli olarak yürütmesi için çok az miktarları yeterli olan ve genelde organizmanın sentezini yeterli miktarda yapmadığı, dışarıdan alınması zorunlu olan organik bileşiklerdir [162].

Vitaminlerin yapılarının ve vücuttaki fonksiyonlarının birbirinden çok farklı oluşları, gıdalarda eser miktarda bulunmaları ve ısı, ışık oksidasyon gibi dış etmenlerden aşırı derecede etkilenmeleri nedeniyle tayinleri oldukça zor, karmaşık ve zaman alıcıdır.

Normal beslenme koşullarında vitamin eksikliğinin ortaya çıkması söz konusu değildir. Bu daima tek yönlü beslenmenin bir sonucudur [163].

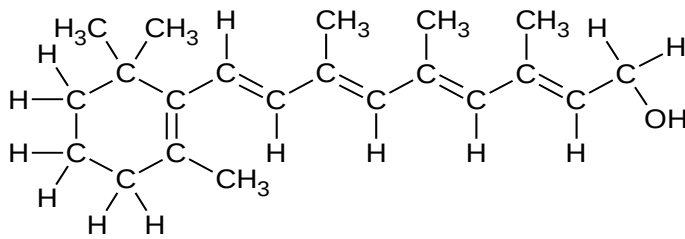
Vitaminler metabolik reaksiyonlarda koenzim olarak görev yapan ya da kendilerine özgü fonksiyonları olabilen, doğal olarak besinler içerisinde yer alan, büyük çoğunluğu ile dış kaynaklı, büyüme, çoğalma ve sağlığın devamı için gerekli az miktarları ile etki yapan küçük organik moleküllerdir. Vücutta sentezlenmedikleri (veya yetersiz miktarlarda sentezlenebildikleri) için mutlaka besinlerle alınmalıdırlar. Vitaminler yapı taşı veya enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Genellikle ısıya dayanıklı maddelerdir. Parenteral yoldan veya sindirim kanalı ile vücuda dâhil olabilirler [163].

Vitaminler, lipofil veya hidrofil olmalarına göre yağda çözünenler ve suda çözünenler diye iki grupta incelenir. Bu sınıflandırma hangi tür besin maddelerinin söz konusu vitamini yüksek konsantrasyonda içerdiği hakkında fikir vermesi bakımından da önemlidir [162].

A, D, E, ve K vitaminleri yağda çözünen vitaminlerdir. Birkaç yönden suda çözünen vitaminlerden ayrılırlar. Gıdaların katı ve sıvı yağlı kısımlarında yer alırlar. Sadece safrada sindirilebilirler, çünkü suda çözünemezler.

1.10.1. A Vitamini

A vitamini organizmada retinol, retinal ve retinoik asit şeklinde bulunur.



Şekil 1.23. A vitamini (retinol) üç boyutlu kimyasal yapısı [164].

Bunlardan retinoik asit diğer formlara dönüşmez. Retinoidler, yağlarda ve yağ çözücülerde çözünürler ve oksidatif koşullar dışında yüksek ısı derecelerine dayanıklıdırlar. Ultraviyole ışını tarafından parçalanırlar ve kloroformdaki çözeltileri 328 nm de karakteristik bir absorpsiyon verir. Saf halde açık sarı kristaller halindedir [44,165].

A vitamini çift bağ içerdiğinden dolayı değişik izomer formlarında bulunur. All-trans retinol memeli dokularında en çok bulunan ve en aktif olan formudur ve cis formuna dönüşebilir. A vitamini cis formuna dönüştüğünde aktivitesinde belirgin şekilde düşüş görülür. Nem, ısı, sıcaklık ve katalizörler molekülün yapısında değişiklik oluşturur. Bu nedenle, saman ve silaj yapımı sırasında oluşan dehidrasyondan dolayı bu vitaminin miktarında azalma meydana gelir [166].

1.10.2. D Vitamini

D vitamini dört halkadan oluşan bir sterol türevi olup, kemik-mineral metabolizmasında önemli rol alan hormon özellikli yağda eriyen bir vitamindir. Vücutta birçok dokuda D vitamini reseptörü (DVR) saptanmıştır [167]. D vitamini reseptörü (DVR) steroid reseptör ailesinin bir üyesidir [168]. D vitamini aile üyeleri siklopentanoperhydrofenantlirene halkasından sentezlenir ve steroidlere benzer yapıdadır. Ancak dört halka yapılan olmadığından dolayı gerçek anlamda steroid değildir. 30'dan fazla D vitamini metaboliti bildirmekle birlikte çoğunluğu inaktif bileşiklerdir [169].

D vitamini, mayada ve mantarlarda ergosterolden (provitamin D₂) ultraviole B (UVB) ışık etkisiyle türemiş ergokalsiferol (D₂ vitamini) ile hayvanlarda deri altındaki yağ dokuda 7-dehidrokolesterolden (provitamin D₃) UVB ışık etkisiyle türemiş kolekalsiferolün (D₃ vitamini) ortak adıdır. D₂ vitamini ve D₃ vitamininin her ikisi de büyük ölçüde aynı yolla metabolize olup, eşit biyolojik güce sahiptirler. İnsan vücudunda sadece D₃ vitamini sentezlenir [170].

D vitamininin deride sentezlenen kolekalsiferol (D₃ vitamini) ve besinlerle alınan ergokalsiferol (D₂ vitamini) olmak üzere iki kaynağı vardır. Diyetle alınan D₂ ve D₃ vitamini, ince bağırsakta misellere katılır ve proksimal ince bağırsaktan emilir. Emilen D₂ vitamini ve D₃ vitamini, kandaki D vitamini bağlayıcı protein (D-binding protein : DBP) ile karaciğere taşınır [171].

Somon balığı, uskumru, ton balığı, sardalya gibi yağlı balık türleri; yumurta sarısı, süt, brokoli, yeşil soğan, maydanoz, su teresi D vitamini yönünden zengindir. Ancak hiçbir besin maddesi günlük D vitaminini karşılayacak kadar D vitamini içermez [172].

Normal koşullarda insan vücudunda bulunan D vitamininin %90-95' i güneş ışınlarının etkisi ile sentez edilir. Bu nedenle D vitamini sentezinde temel kaynak güneş ışığıdır. Bu sentez, ülkenin bulunduğu enlem, mevsimler, güneş ışınlarının yeryüzüne geldiği açı

(Zenith açısı), güneşlenme saati ve süresi, deri pigmentasyonu, hava kirliliği düzeyi, deriye sürülen koruyucu kremler, giyinme tipi gibi faktörlere bağlıdır. Faktör düzeyi 15 veya üzerindeki koruyucu kremlerin kullanılması %99 oranında güneş ışınlarının deriye ulaşmasını engellemektedir [173].

Karaciğerde kolesterolden sentez edilen 7-dehidrokolesterol (provitamin D₃) kan yoluyla derinin malpighi tabakasına gelir. Güneş ışınlarında bulunan ultraviyole B (290-310 nm dalga boyunda) etkisi ile kolekalsiferole (D₃ vitamini) dönüştürülür [172].

7-dehidrokolesterol ultraviyole B ışınları etkisi ile deride önce previtamin D' ye daha sonra vücut ısı ile hızla D vitaminine dönüşür. Aynı zamanda bu dalga boyundaki güneş ışınları D vitaminini parçalayarak inaktif ürünlere (lumisterol, takisterol) dönüştürür. Bu mekanizma, güneşlenmenin neden D vitamini toksisitesine yol açmadığını açıklar [174].

Güneşlenmeye bağlı deriden optimal D vitamini sentezi yapılabilmesi için güneş ışınlarının atmosfere ulaşma açısı önemli olduğu kadar, güneşlenme süresi ve güneşe maruz kalan deri yüzeyinin boyutları da önemlidir. Deriden D vitamini sentezi için sınır değer olarak cm başına 18-20 mJ ultraviyole B (UVB) ışını gerekmektedir [175].

1.10.3. E Vitamini (α -tokoferol)

E vitamini, diğer yağda eriyen vitaminlerden farklı olarak vücutta depolanma süresi fazla değildir. Başlıca yağ dokusu, karaciğer ve kaslarda depolanmaktadır. Ana depolanma yeri yağ dokusudur. E vitaminine gereksinim olduğunda yağ dokusundan ve karaciğerden salınır, yağ dokusundan salınımı çok yavaş olur. Karaciğerde depolanma hızlıdır, fakat çevrimi de hızlıdır. E vitamini, antioksidan, immünomodülatuar ve antitrombosit etkileri olan bir vitamindir. E vitamini, lenfosit proliferasyonunu artırmakta, immünoşüpresif prostoglandin E₂ yapımını azaltmakta ve immünoşüpresif serum lipit peroksidlerini azaltmaktadır. Skar oluşumunu engellemekte, yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. En önemli işlevi, antioksidan işlevidir. E vitamininin majör bileşeni olan α -tokoferol, membran ve lipoproteinlerin içindeki en önemli antioksidandır. Hücre membranlarında poliansatüre membran lipitlerinin peroksidasyonunu önler. Antioksidan etkisi, selenyum içeren GSH-Px'in etkisine benzemektedir. E vitamini, serbest O₂ radikalleriyle, çoklu doymamış yağ asitlerinden daha çabuk reaksiyona girer. Böylece yağ peroksidasyonunu engelleyebilir. Bir anlamda hücre membranını stabilize edici etkisi vardır [176].

E vitamini, LDL (Low Density Lipoprotein), içindeki lipitlerin oksidasyonunu engellemektedir. LDL kolesterol içindeki lipitlerin oksidasyonu ile kardiyovasküler hastalıklar arasında ilişki kurulmaktadır. LDL kolesterolün oksidasyonunu azaltarak koroner kalp hastalığı riskini azaltmaktadır. Bitkisel yağlar, kuruyemişler, işlenmemiş tahıllar, yeşil yapraklı sebzeler E vitaminince zengin besinlerdir. Anne sütünde litrede 1.8 mg E vitamini bulunmaktadır. İnek sütünde ise litrede 0.4 mg E vitamini bulunmaktadır. Normalde plazma E vitamini düzeyleri on iki yaşından küçüklerde 3-15 gr/ml, 12 yaşından büyüklerde ve erişkinlerde 5-20 gr/ml değerleri kabul edilen normal değerlerdir [176].

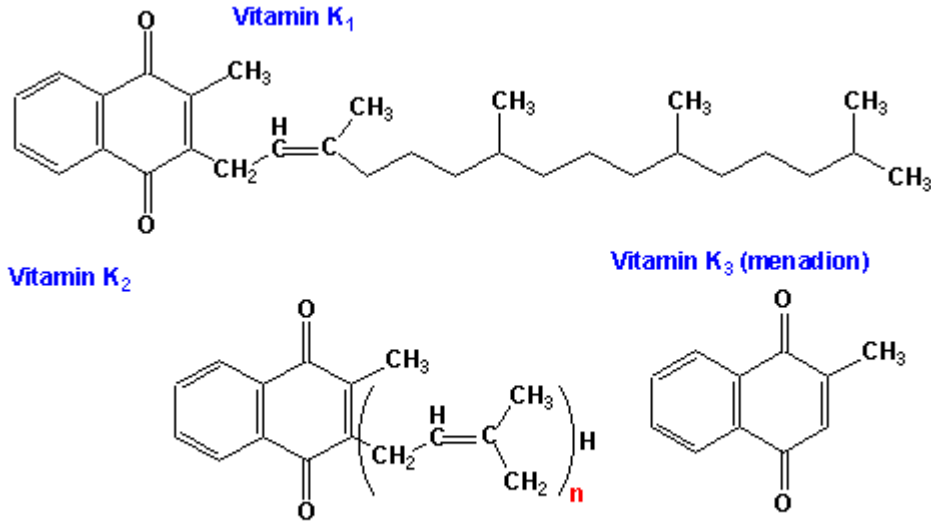
İnsanlarda E vitamini eksikliğinin başlıca semptom ve bulguları; üreme bozuklukları, karaciğer, kemik iliği, beyin işlev anomalileri, hafif hemolitik anemi (eritrosit fragilitesinde artış), embriyogenez bozuklukları, kapiller permeabilite artması, iskelet kası distrofisi, bazen kardiyomiyopati ve spinoserebellar hastalık şeklinde ortaya çıkmaktadır [177].

1.10.4. K Vitamini

K vitamini yağda eriyen vitaminlerden biridir. Biyokimyasal olarak yapısında 2-metil-1,4-naftokinon grubu içerir. Doğada iki tane doğal, bir de sentetik olmak üzere üç tipi mevcuttur. Temel olarak bütün türevleri naftakinon yapısındadır [97].

K1 vitamini (fitonadion yada filokinon): 2-metil-3-fetil-1,4-naftakinon kimyasal yapısına sahip olan öncelikle yiyeceklerden alınan ve alındığı formuyla dolaşıma katılan K vitamin türüdür. Yüksek yapılı bitkilerde ve yeşil yapraklı bitkilerde çok yüksek konsantrasyonda bulunur. Bu vitamin yeşil yapraklı bitkilerin yapraklarında sentezlenir. Fotosentezde ve fosforilasyonda rol oynar [97].

K2 vitamini (menakinon): Naftokinon grubuna eklenmiş difanersil grubu içerir. Bu gruptaki vitaminler MK-n olarak ifade edilirler, (n) alifatik yan zincirdeki izoprenoid kalıntılarının sayısını belirler. Menakinonlar doğal olarak oluşabilirler fakat bitkiler tarafından üretilmezler daha çok fermentasyon yapan mikroorganizmalar ve insanda terminal ileum ve kolonda yerleşmiş olan bağırsak bakterileri tarafından sentez edilir.



Şekil 1.24. K vitamini türevleri

Menakinon orijinal olarak mikrobiyal sentez sonucu kokuşmuş balık yemeğinde izole edilmiştir. Son yıllardaki çalışmalar K vitamininin hayvanlardaki en yaygın formu menaquinon-4 (MK-4) bağırsak bakterileri tarafından egzogen naftakinondan üretilir ve K vitamininin biyolojik olarak en aktif formudur. Japonyada osteoporoz tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar MK-4 ün diyetle alınan vitamin K1 den dönüştüğünü ve daha sonra birçok dokuda yüksek konsantrasyonda depolandığını göstermektedir. Yiyeceklerden peynirde ve japon yöresel yiyeceği nattoda bulunur [178].

K3 vitamini (menadione): Yağda çözünen sentetik olarak üretilen en basit yapılı K vitamini türevidir. Bu vitaminden türeyen MBS ve menadion sodyum difosfat suda çözünen K vitamini türevidir [97].

1.11. *Saccharomyces cerevisiae*

Bilimsel sınıflandırma

Alem: Fungi

Bölüm: Ascomycota

Alt bölüm: Saccharomycotina

Sınıf: Saccharomycetes

Takım: Saccharomycetales

Familiya: Saccharomycetaceae

Cins: *Saccharomyces*

Tür: *Saccharomyces cerevisiae* [179].

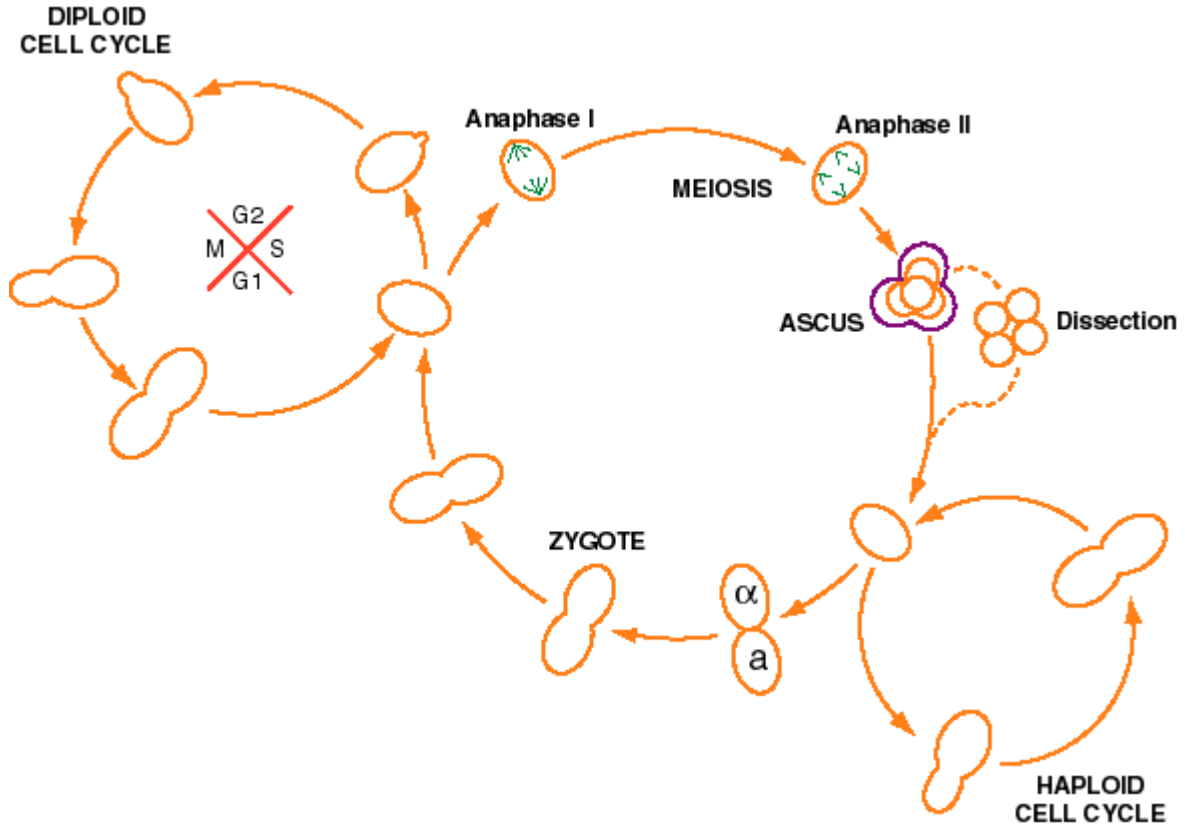
Mayalar mantar ailesinin geniş bir bölümünü oluşturur. Doğada çok yaygın olarak bulunan mayaların hücre yapıları büyük oranda proteinler, polisakkaritler, lipidler ve nukleik asitlerden oluşur. Maya bir hücreli bir ökaryottur. Hücre büyüklüğüne göre bakterilerle yüksek mantarlar arasında yer alırlar [180]. Maya hücre zarı ise genellikle protein, lipid ve fosfat yapıdadır. Genel olarak maya hücrelerinin %75'i su, geri kalanı ise diğer maddelerdir. Diğer maddelerin yaklaşık yarısını proteinler, geri kalan kısmını da karbonhidratlar, yağlar, aminoasitler, peptidler, vitaminler ve enzimler oluşturur. Mayalarda bulunan enzimler hidrolazlar ve desmolazlar olarak iki ana gruba ayrılabilir. Hidrolaz enzimleri karbohidrolaz, proteaz ve esterazlardır. Karbohidrolazlardan olan glikonaz yedek besin maddesi glikojeni glikoza, sakkaraz sakkarozu glikoz ve fruktoza, maltaz maltozu glikoza dönüştürür. Proteazlar yüksek moleküllü proteinleri hidrolize ederek parçalayan enzimlerdir. Esterazlardan olan lipaz, yağları hidroliz eder, fosfataz ise fosforik asitin organik bileşimlerini parçalayarak fosforik asit açığa çıkarır. Desmolaz enzimleri yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini katalizler. Ayrıca hücre zarında permaazlarda denilen ve dış ortamdan hücre içerisine madde transferini sağlayan enzimler de bulunmaktadır. Mayaların üremeleri bölünerek ya da tomurcuklanarak olmaktadır. Bölünerek çoğalan maya hücreleri, hücre ortasından bölünerek bir ara bölme oluşturur ve buradan hücre ikiye ayrılarak aynı büyüklükte iki yavru hücre oluşur. Tomurcuklanarak çoğalan mayalar uygun çevre koşulları bulurlarsa tomurcuklanma ile bir hücreden bir veya daha çok çıkıntı meydana gelir ve bunlar yeni hücreler halinde gelişir. Gelişen bu hücreler daha sonra ana hücreden ayrılır. Tomurcuklanarak çoğalan bir maya hücresi yaklaşık 50-55 defa tomurcuklanabilmektedir [181].

Bazı mayalar eşeyli olarak da ürer. Bu üremede birbirine uygun iki haploid maya hücresi birleşir ve zigot oluştururlar. Zigot kendi hücresi içerisinde mayoz bölünme geçirir ve dört tane haploid askospor oluşturur. Zigotun hücre çeperi de askus olarak görev yapar. Askuslar parçalandığında askosporlar serbest kalır. Askosporlar tomurcuklanmak suretiyle eşeysiz olarak çoğalabilir ve popülasyonlarını arttırabilirler. Ayrıca bunlar genetik olarak kendilerine karşılık gelen diğer askosporlarla birleşip yeniden diploid hücreler oluşturabilirler. Bu hücreler aktif şekilde tomurcuklanarak eşeysiz üremeye devam edebildikleri gibi mayoz bölünme geçirerek yeniden askus ve askosporları da oluşturabilirler. Bu durumda eşeyli üreyen mayaların hayat devrinde haploid ve diploid olarak iki faz bulunmaktadır. En iyi araştırılmış maya türü *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bu organizma tomurcuklanarak eşeysiz olarak üreyebildiği gibi askospor oluşturarak eşeyli

olarak da ürer. Hayat devresinde hem haploid hem diploid safha vardır [181]. Maya hücreleri haploit ve diploit biçimde varlıklarını sürdürebilirler. Haploit hücreler mitoz ve büyümeden ibaret basit bir yaşam döngüsüne sahiptirler ve yüksek stresli ortamda genelde ölürler. Diploit hücreler de mitoz ve büyümeden oluşan bir yaşam döngüsüne sahip olmakla beraber stres halinde sporlanıp mayoz bölünmeye giderler, çeşitli haploit sporlar oluştururlar ve bu sporlar çiftleşip yeniden bir diploit hücre oluştururlar. Mayanın α ve a olarak adlandırılan iki eşey tipi vardır, haploit hücrelerin eşleşebilmek için iki farklı eşey tipine sahip olmaları gerekir [182].

Mayalar genellikle şekerlerin bulunduğu meyveler, çiçekler ve ağaç kabukları gibi ortamlarda yaygındırlar. Birçok maya türü hayvanlarla, özellikle böceklerle birlikte simbiyoz olarak yaşar. Bazı türler ise insan ve hayvanlarda patojendir. Ticari olarak en önemli mayalar hamur, bira ve şarap mayaları olup bunlar, *Saccharomyce*’ in türleridir.

Mayaların orijinal habitatları meyveler ve meyve sularıdır. Ancak günümüzde kullanılan ticari mayalar, bu orijinal ırklardan çok farklı olup yıllar boyunca seleksiyona uğramış ve genetik olarak manipüle edilmiş kültür ırklarıdır. Hamur ve alkollü içki sanayinde kullanılan mayalar bütün funguslar içerisinde biyolojik olarak en iyi bilinen organizmalardır. Bir hücreli olduklarından kolayca incelenirler. *Saccharomyces cerevisiae* (*E.coli* gibi) biyolojide en çok çalışılmış model organizmalardan biridir. *S. cerevisiae* bu konuma endüstrideki yaygın kullanımından dolayı ulaşmıştır.



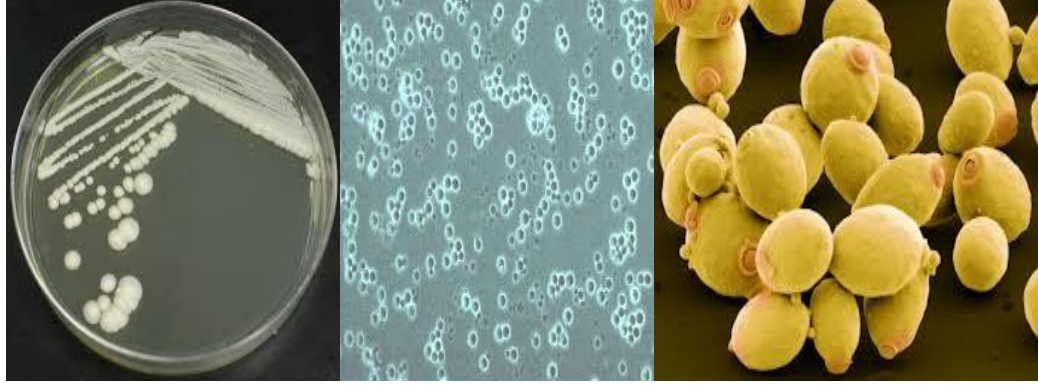
Şekil 1.25. *S. cerevisiae*' nin yaşam döngüsü [179,181].

İnsan biyolojisinde önemli olan pek çok protein önce mayada bulunan karşılıklarının araştırılması sonucunda keşfedilmiştir. Ökaryot biyolojisindeki problemler en kolay şekilde bu organizmalar üzerinde çalışılarak çözülebilmektedir [179-181].

Saccharomyces cerevisiae genomu 1996'da tamamlanmıştır [183]. 16 tane kromozomu bir de mitokondri DNA'sı vardır. CA enzimini kodlayan NCE103 geni XIV. kromozom üzerinde bulunur ve intron bölge içermez. Enzim 221 aminoasit rezidüsünden oluşur ve 24.8 kDa ağırlığındadır [184].

Maya hücreleri, hücre boyutları, şekilleri ve renkleri bakımından geniş bir dağılım gösterirler. Hücre biçimleri genellikle küresel, elipsoidal, uç kısımları küresel silindirik (limon yapısına benzer) veya oval olabilmektedir. Mayaların hücre çapları bazı türlerde farklılık göstermesine karşın, genellikle 1-10 µm aralığında değişmektedir. Mayaların gelişebilmeleri ve aktivitelerini devam ettirebilmeleri için bazı ortam şartlarına ve bazı besin maddelerine ihtiyaçları vardır. Mayaların üremelerini etkileyen en önemli ortam şartları pH, sıcaklık ve havalandırmadır. Mayalar asidik ortamda gelişebilen mikroorganizmalardır. Mayalar için en uygun üreme pH'ı 4,0-4,5'tir. Ayrıca mayalar 0-50°C arasında değişen geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilir. Mayadan mayaya fark

etmesine rağmen genellikle hepsi en iyi üremeyi 25-27 °C’de gösterir. Ancak daha düşük ve yüksek sıcaklık maya aktivitesini ve üremesini oldukça yavaşlatır. Mayaların üremesini etkileyen bir diğer etken ise havalandırmadır. Mayalar oksijenli ve oksijensiz ortamda üreyebilirler. Ancak havalandırılmalı ortamda daha hızlı ürerler. Oksijensiz ortamda ise besin maddesini etil alkole dönüştürürler.



Şekil 1.26. *Saccharomyces cerevisiae*’ye ait makroskopik ve mikroskopik (fleurosanmikroskop, elektron mikroskobu) görüntüler

Maya büyümesine ortam şartları dışında bazı besin maddeleri de doğrudan etki eder. Heterotrof bir mikroorganizma olan mayaların en önemli ve üremesini kısıtlayan ve kontrol eden besin maddesi karbonhidratlardır. Bu karbonhidrat kaynağı glukoz, sakkaroz, fruktoz, mannoz veya laktoz olabilir. Mayaların üremesine etki eden bir diğer önemli madde ise azottur. Bunun yanında potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum gibi maddelere de ihtiyaç duyarlar [185].

İnsanlık tarihinde ilk kullanılan mikroorganizmalar mayalardır. Günümüze kadar yaklaşık 700 çeşit maya kültürü belirlenmiş olmakla beraber yeni maya kültürlerinin tanımlanmasına da halen devam edilmektedir. Mayalar binlerce yıldır insanlar tarafından değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Mayaların ilk olarak Babil’liler, Sumer’ler ve Mısır’lılar tarafından bira ve şarap üretiminde ve hamurun mayalanmasında kullanıldığı sanılmaktadır. Modern çağda ise mayalar geleneksel gıda endüstrisinde (ekmek mayası üretimi, çeşitli enzimler, pigmentler, gıda asitlendiricilerin elde edilmesi) kullanımlarının yanı sıra, birçok fermentasyon prosesinde (bira, etanol) de kullanılmaktadır. Mayaların gelecekte yenilenebilir enerji kaynaklarında, çevresel biyoteknolojide ve insan sağlığını ilgilendiren pek çok biyolojik gelişmede daha geniş uygulama alanı bulacağı beklenmektedir. Enerji üretimi açısından bakıldığında mayaların metabolik olarak etanol

ürettikleri bilinmektedir. Bu üretimi yenilenebilir karbonhidratlar üzerinden gerçekleştirdiği göz önüne alındığında bunun büyük bir avantaj sağlayacağı görülmektedir. Mayaların çevresel biyoteknolojide de gittikçe artan önemde kullanılacağı tahmin edilmektedir. Atık sulardan biyosorpsiyon ve biyobirikim yöntemleriyle ağır metal iyonlarının ve boyar maddelerin giderimi ve geri kazanımı çalışmalarında çeşitli türdeki mayalar başarıyla kullanılmaktadır. Mayaların zorlu ortam koşullarında, örneğin, asidik ve toksik etkiye sahip ağır metal iyonu içeren ortamlarda üreyebilme dayanıklılığı göstermesi ve bu türlü maddeleri hücre içerisine alabilme özelliğinin bulunması (biyobirikim), mayaların diğer mikroorganizmalara göre üstünlüğünü göstermektedir. İlaç endüstrisinde aşı üretimi ve özellikle insan tedavi amaçlı proteinlerin, hormonların ve kan faktorlerinin üretiminde de mayalar kullanılmaktadır. Tek hücre proteinlerinin üretilmesi ve bunların farklı fonksiyonel gruplar içermesi önemli uygulamalardan sayılabilir [186].

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dimetil sülfoksit (DMSO), metanol (CH₃OH), linolenik asit (18:3, n 3), Twin 40, β- karoten, kloroform (CHCl₃), resveratrol, Quarcetin, 2- tiyobarbiturik asit (TBA), asetik asit (CH₃COOH), sodyum hidroksit (NaOH), n-Butanol (C₄H₉OH), Trisbase((HOCH₂)₃CNH₂), Tris HCl (hydroxymethyl aminomethane hydrochloride), Potasyum klorür (KCl), FeCl₂, H₂O₂, butilhidroksitoluen (BHT), n-hekzan, 2-propanol, sülfirik asit(H₂SO₄), KH₂PO₄, Pepton water, glukoz, malt extract, nutrient broth, glutatyon (GSH), KOH, albumin, bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O), folin reaktifi, Sodyum Karbonat(Na₂CO₃), sodyum potasyum tartarat, asetonitril, n-hekzan, n-heptan, izopropanol, aseton, KHCO₃, sodyum sitrat, 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), Tris-EDTA tamponu, trikloroasetik asit (TCA), hiroklorik asit (HCl).

2.2. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar

Cam malzemeler:

Pipet, erlen, beher, mezür, kapaklı cam tüp, petri kabı, huni, baget,

Cihazlar:

Laminer flow kabin buzdolabı, derin dondurucu, etüv, vorteks, pastör fırını, otoklav, santrifüj, sonikatör, UV spektrofotometre, gaz kromatografisi, HPLC cihazı, ultrasonik su banyosu, su banyosu, hassas terazi, saf su cihazı.

Diğer Malzemeler

Alüminyum folyo, pamuk, eppendorf, 50 ml'lik falcon, 15 ml'lik falcon, piset,

2.3. İnceleme Materyali

In vitro da sentezi yeni gerçekleştirilmiş olan 11 adet organik maddenin biyolojik etkinliği araştırıldı. Öncelikle organik maddelerin serbest radikal giderme aktivitesinin ölçülmesi için *in vitro*'da DPPH metodu uygulandı ve lipid peroksidasyon (LPO) ölçümü yapıldı. *In vivo*'da yapılacak çalışmalar için ökaryotik bir hücreli canlı olan maya (*Saccharomyces cerevisia*) kullanıldı. Maya stok kültürünün oluşturulmasında ticari olarak satılan Yuva marka yaş maya tercih edildi. Organik maddeler oluşturulan sıvı maya kültür

ortamına eklendi ve GSH, protein, MDA, yağ asidi, vitamin analizi yapılarak organik maddelerin etkinliği araştırıldı.

2.4. *Saccharomyces cerevisiae* Kültürünün Hazırlanması

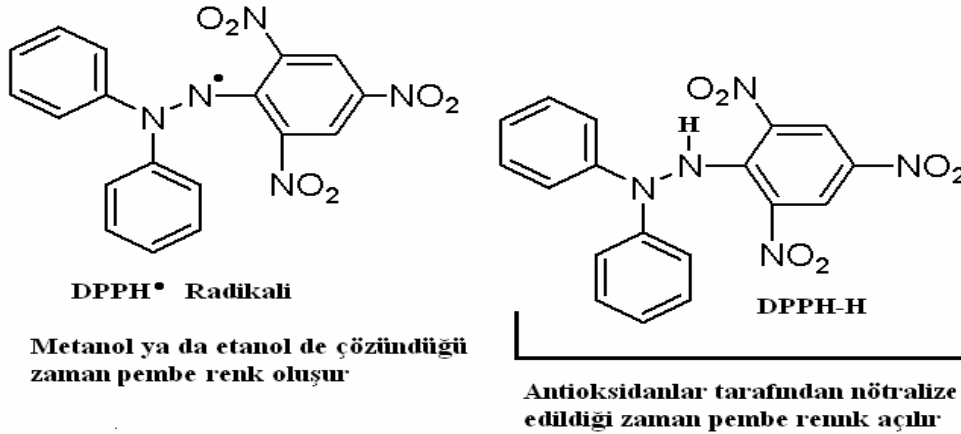
Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *Saccharomyces cerevisiae* FMC16'nın gelişimi ve çoğalması için YEDP (100 ml için 1g yeast extract, 2g bactopecton, 2g glukoz) besiyeri ortamı hazırlandı [187].

Besiyeri tartılıp eklendikten sonra, erlenlere 200 ml distile su ilave edilerek besiyerlerinin otoklavda sterilizasyonu sağlandı. Steril besiyerleri ekim yapılmak üzere laminar flow kabine alındı. Kabinde ortamlara Yuva marka yaş maya kullanılarak inokülasyon yapıldı ve etüvde 30 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda etüvden çıkarılan örnekler tekrar laminar kabin içine alındı ve burada agara ekim yapılarak *Saccharomyces cerevisiae*'nin stok kültürleri oluşturuldu. Stok kültürler buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Stok kültürler 20 gün aralıklarla çalışmada kullanılmak üzere taze olarak hazırlandı.

2.5. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi

DPPH, serbest radikal temizleme aktivitesi Betty Hsu vd. [188], tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Serbest radikal olarak 25 mg/l 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), metanolde hazırlanılarak kullanıldı. Öncelikle her bir organik maddemizden 0,002 gr tartıldı ve 1 ml DMSO'da çözerek eppendorflara alındı. Hazırlamış olduğumuz DPPH çözeltisinden cam tüplere 4 ml eklendi ve eppendorflara hazırladığımız her bir organik maddeden sırasıyla 10, 20, 30µl alarak DPPH çözeltisi üzerine eklendi. Karışımlar, oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda absorbansları 517 nm'de spektrofotometrede blanka karşı okunarak kaydedildi [189]. Azalan absorbans, geriye kalan DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesi olarak belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ DPPH Temizleme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrol ABS} - \text{Sample ABS}}{\text{Kontrol ABS}} \times 100$$



Şekil 2.1. DPPH radikalinin giderilmesi

2.6. *In vitro* Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) ölçümü:

In vitro ortamda lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için 5 ayrı gruba çalışıldı. Öncelikli olarak tampon çözelti hazırlandı. (tampon çözelti; 1,66 g tris base, 5,72 g tris HCl, 12 g KCl, 2 g TWEEN 40 ve 1 lt distile su içerir) ve örneklerimiz deney tüplerine alındı ve aşağıda belirtildiği gibi gruplara ayrıldı:

Kontrol	5 ml tampon ç.	20 µl linoleik asit			
Organik madde	5 ml tampon ç.	20 µl linoleik asit	1 ml H ₂ O ₂	1ml FeCl ₂	10 µl o. madde
FeCl ₂	5 ml tampon ç.	20 µl linoleik asit	1 ml H ₂ O ₂	1ml FeCl ₂	
Quercetin	5 ml tampon ç.	20 µl linoleik asit	1 ml H ₂ O ₂	1ml FeCl ₂	10 µl Quercetin
Resveretrol	5 ml tampon ç.	20 µl linoleik asit	1 ml H ₂ O ₂	1ml FeCl ₂	10 µl Resveretrol

Bu şekilde tüm gruplardaki örneklere ekleme yapıldıktan sonra deney tüpleri vortekslendi ve 24 saat süreyle 37 °C’de etüvde bekletildi. Süre sonunda örnekler etüvden çıkarıldı ve 100 µl BHT çözeltisi eklendi. Örneklerimizden 1 ml kapaklı santrifüj tüplerine alındı ve üzerine 1 ml TBA çözeltisi ile 1 ml distile su ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve kapakları kapatılarak 95 °C’de etüvde 45 dk süreyle bekletilerek pembe renk oluşumu gözlemlendi. Süre sonunda etüvden çıkarılan örnekler soğutuldu ve üzerine 3 ml n-bütanol eklendi. Faz oluşumu gerçekleştikten sonra örnekler 5000 devirde (rpm) 7 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst faz dikkatlice alındı ve absorbans değerleri spektrofotometrede 532 nm’de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.7. *Saccharomyces cerevisiae*'nın Gelişme Ortamında Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *Saccharomyces cerevisiae* FMC16'nın gelişimi ve çoğalması için YEDP (100 ml için 1 g yeast extract, 2 g bactopecton, 2g glukoz) besiyeri ortamı hazırlandı [187]. Besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı;

Kontrol: 1ml <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inoküle edilen YEDP besiyeri ortamı
Gruplar: 1ml <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inoküle edilen YEDP besiyeri ortamı + 50 µl organik madde

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, gruplardaki örnekler % 4'lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyon olması engellendi ve örnekler santrifüj edilerek hücre pelletinden ayrıldı. Elde edilen pellet fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kalan pellete 3 ml TEA (0.03 M Tris, 114 µl Asetik asit, 0,5 M EDTA) tamponu ilave edildi ve 40 saniye sonikasyon yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra +4 °C'de 9000 devirde (rpm) 10 dk süre ile santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımları glutatyon ve protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla tüplere alındı. Geriye kalan pellet kısmına ise hekzan/izopropanol eklenerek ortamdaki yağ asidi miktarları belirlendi.

2.7.1. Maya Hücresinde Glutatyon Miktarının Ölçülmesi

Bu amaçla elde edilen süpernatanta 1 ml %10'luk TCA ilave edildi. Bu şekilde proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Karışım bu şekilde yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında bekletildi ve bu sürenin sonunda 4500 devirde (rpm) 10 dk santrifüj edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Proteinler çöktürüldükten sonra üst süpernatant kısım başka bir deney tüpüne alındı ve GSH miktarını ölçmek için aşağıdaki işlemler yapıldı. Süpernatant kısım üzerine 0,3 M Na₂HPO₄ çözeltisinden 2 ml ilave edildi ve 1ml 150 µM DTNB çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı, 5-10 sn sonra oluşan sarı renk oda sıcaklığında iyice stabil hale geldikten sonra 412 nm'de köre karşı okundu [190].

2.7.2. Glutasyon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Örneklerdeki GSH miktarı tayini, saf GSH standardından (Merck) hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bunun için; saf glutatyondan 10 ml için 0.002 g olacak şekilde hazırlandıktan sonra aşağıdaki şekilde gruplar oluşturuldu:

S1→ 20 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

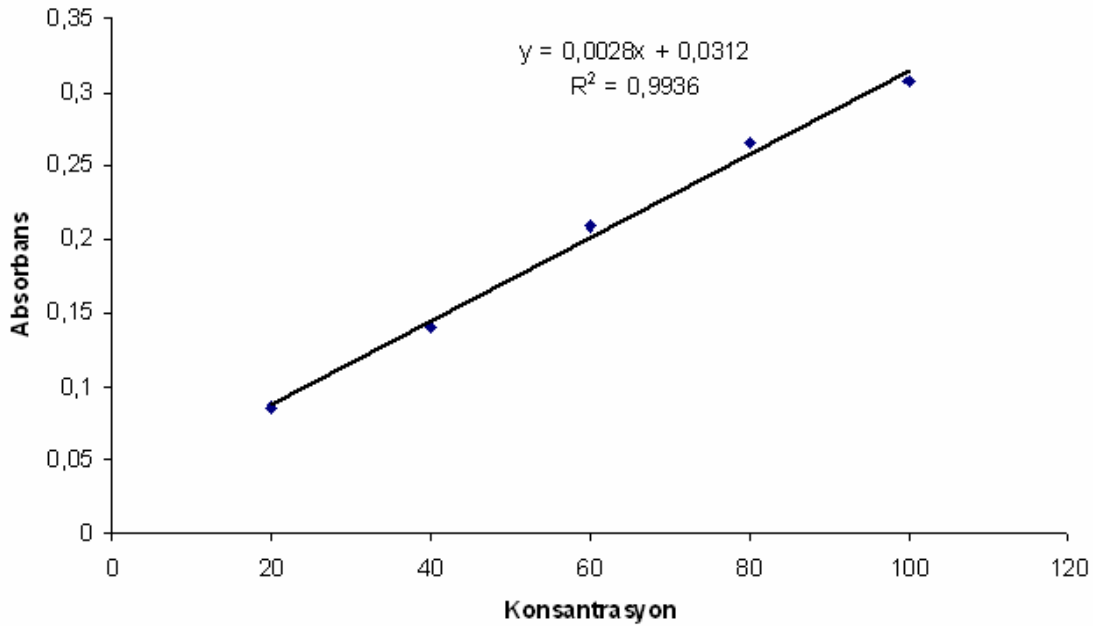
S2→ 40 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S3→ 60 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S4→ 80 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S5→ 100 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

Gruplar stabil hale geldikten sonra 412 nm’de köre karşı okundu ve okunan değerlere göre Şekil 2.2’deki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. GSH miktarının hesaplanmasında mg/g pellet miktarı cinsinden belirlendi.



Şekil 2.2. Glutasyon Kalibrasyon Eğrisi

2.7.3. Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Örneklerin total protein miktarlarının ölçümü Lowry yöntemine göre yapıldı [191]. Bu amaçla aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

A= %1 (w/v) Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi

B= %2 (w/v) Sodyum potasyum tartarat

C= 0.2 M Sodyum hidroksit

D= %4 (w/v) Sodyum karbonat

Protein ile ilgili deney yapılacağı zaman 49 ml C reaktifi üzerine 49 ml D reaktifi ilave edildi, daha sonra 1 ml A ve 1 ml B reaktifinden ilave edildi. Bu çözeltilerin karışımından hazırlanan reaktife E solüsyonu adı verildi. Daha sonra protein çözeltisinden deney tüpüne alındı ve örnek üzerine 4 ml E reaktifinden ilave edildi, karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonunda 500 μl Folin (10 ml Folin-Ciocalteu reaktifi üzerine 10 ml saf su ilave edilerek hazırlanır) karışımında eklenerek 30 dakika tekrar oda sıcaklığında bekletildi ve sonra 750 nm’de köre karşı spektrofotometrede okundu.

Total protein ölçümünde maya hücresinde proteinler çöktürüldükten sonra elde edilen pellete 1ml distile su ilave edilip vortekslendi, tekrar santrifüj edildi ve oluşan süpernatanta ölçüm yapıldı. Deney hayvanlarında ise alınan uygun miktardaki doku örnekleri Tris-HCl ve EDTA (pH:7) tamponu ile homojenizasyondan sonra +4 °C’de 9000 devirde (rpm) 10 dk süre ile santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldıktan sonra oluşan süpernatant kısım alınarak Lowry metodu uygulandı [191].

2.7.4. Protein Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Bu amaçla saf haldeki albuminden 10 ml için 0,003 g olacak şekilde hazırlandıktan sonra standart grupları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

S1→ 100 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

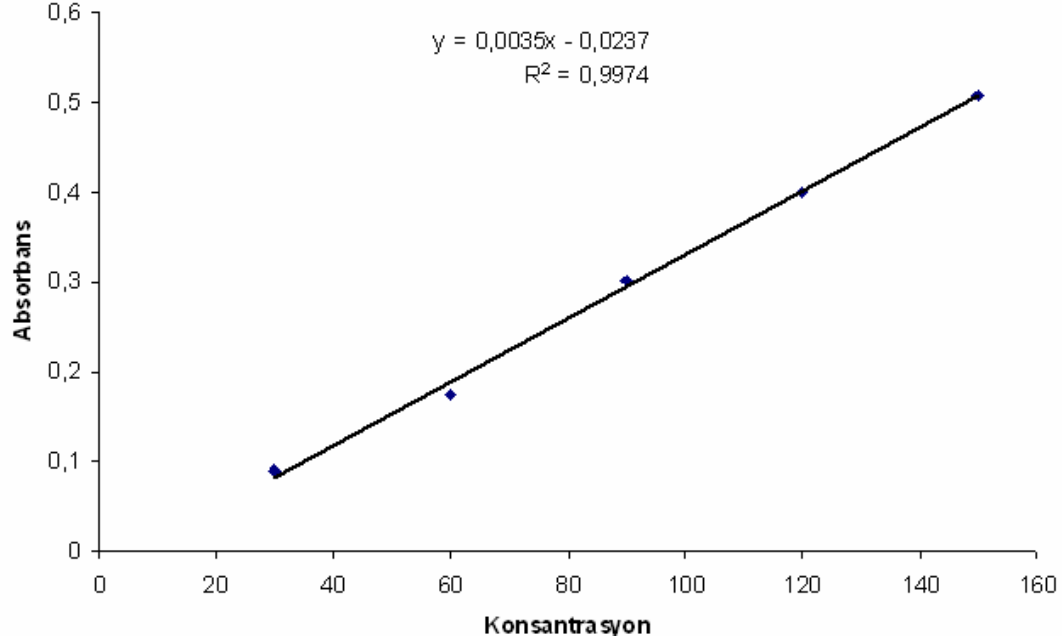
S2→ 200 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S3→ 300 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S4→ 400 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S5→ 500 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

Gruplar 750 nm’de köre karşı okundu ve okunan değerlere göre Şekil 2.3’deki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerin protein miktarları elde edilen bu kalibrasyon eğrisindeki denklem vasıtasıyla hesaplandı.



Şekil 2.3. Protein Kalibrasyon Eğrisi

2.8. Maya Hücresinden Lipidlerin Ekstraksiyonu

Maya hücresinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan izopropanol karışımın kullanıldığı Hara ve Radin [192] metoduyla yapıldı. Bunun için maya hücreleri Micra–D.8 homojenizatöründe 11000 devirde (rpm) 30 sn ile 3:2 (v/v) oranında 10 ml hekzan-izopropanol ile parçalandı. Homojenizasyon kabı 2 ml parçalama çözeltisi ile yıkandı ve santrifüj tüplerine alındı. Daha sonra 4500 devirde (rpm) 10 dk süre ile santrifüj edilen maya örneklerinden üst süpernatant kısım alınarak ağzı kapaklı deney tüplerine konuldu.

2.8.1. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Lipitler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografik analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip olan *metil esterleri* gibi türevlerine dönüştürülmesi gerekir. Lipitler içindeki yağ asitlerini, metil esteri gibi türevlerine dönüştürülmesinde değişik metodlar kullanılmasına rağmen, Christie [193] ifade edildiği gibi uygulaması pratik ve verimi yüksek olan asit katalizli esterleştirme yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle göre:

Metil esterleri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipit ekstraktı 30 ml'lik sızdırma yapmayan deney tüplerine alındı. Üzerine % 2 'lik metanolik sülfürik asitten 5 ml ilave edildi, vortex ile iyice karışmaları sağlandı. Bu karışım 50 °C'lik etüvde 15 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı. 15 saatlik süre sonunda, tüpler etüvden çıkarıldı oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve 5 ml % 5 lik sodyum klorür ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml hekzan ile ekstre edildi ve hekzan fazı üstten pipetle alınarak 5 ml %2'lik KHCO_3 ile muamele edildi ve fazların ayrılması için 4 saat bekletildi. Daha sonra metil esterlerinin içeren karışım, 45 °C'de ve azot akımı altında çözücüsü uçuruldu, 1 ml hekzan ile çözülerek 2 ml'lik ağzı kapaklı otosampler vialleri içine alınarak gaz kromatografisinde analiz edildi.

2.8.2. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz kromatografik Analizi

Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC-17 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25 μm iç çapında ve PERMABOND 25 mikron film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Germany) kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120–220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu. Kolon sıcaklık programı 120 °C'den 220 °C'ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200 °C'ye kadar 5 °C/dk ve 200 °C'den 220 °C'ye kadar 4 °C/dk olarak belirlendi. 220 °C'de 8 dakika tutuldu ve toplam süre 35 dk olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örnekler ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemten sonra gerekli programlama yapılarak örnekler ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı [194].

2.9. Maya Hücrelerinde ADEK Vitaminleri ve Kolesterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi

5 ml süpernatant 25 ml 'lik ağzı kapaklı tüpler içine alınarak üzerine % 5'lik KOH çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra 85 °C'de 15 dk bekletildi. Tüpler çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 5 ml saf su ilave edildi ve karıştırıldı.

Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 ml hekzan ile extrakte edildi. Hekzan fazı azot akımı ile uçuruldu. 1 ml (% 50 + % 50, v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülerek otosampler viallerine alındı ve analiz edildi.

Analiz, Shimadzu marka HPLC cihazı ile yapıldı. Cihazda pompa olarak LC-10 ADVP UV-visible detectör olarak SPD-10AVP, kolon fırını olarak CTO-10ASVP, otosampler olarak SIL-10ADVP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP software (Shimadzu, Kyoto Japan). Mobil faz olarak asetonitril/metanol (%60+%40, v/v) karışımı kullanıldı.

Mobil faz akış hızı 1ml olarak belirlendi. Analiz için UV dedektör kullanıldı. Kolon olarak da Süpelcosil LC 18 (15×4.6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. Avitamini için dedeksiyon dalga boyu 326 nm, E vitamini için 202 nm, D ve K vitaminleri için 265 nm kullanıldı [195].

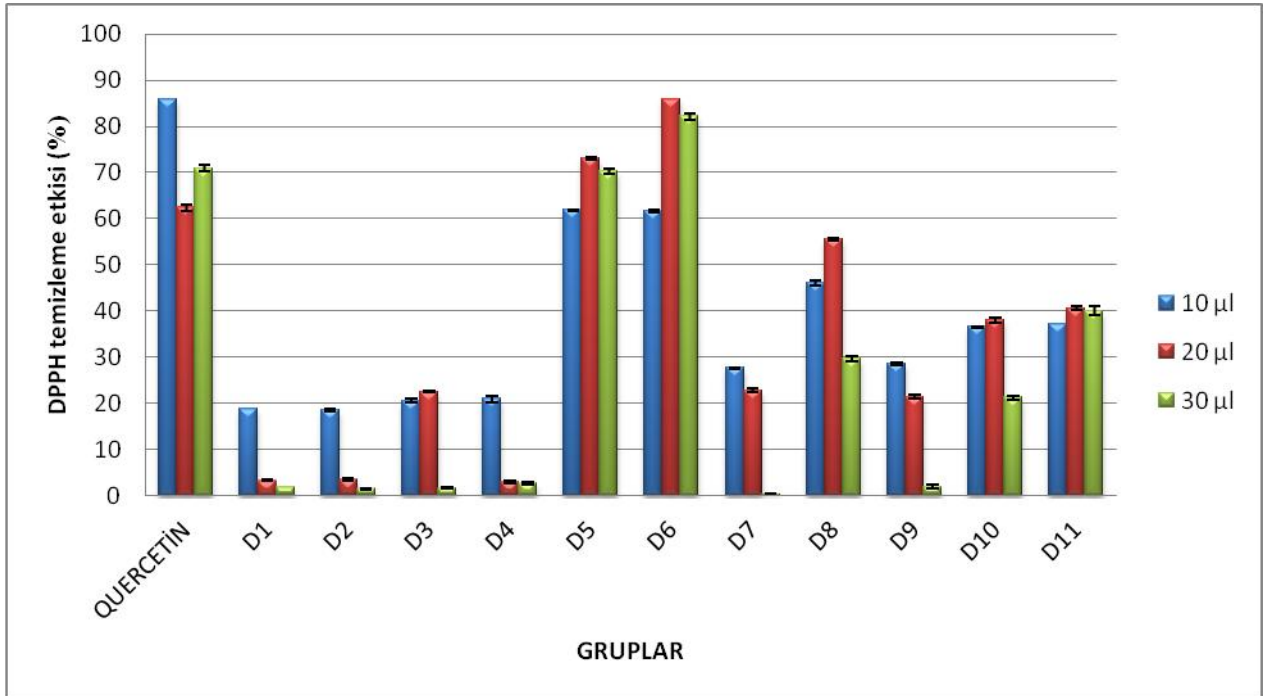
3. BULGULAR

3.1. Organik Maddelerin DPPH Radikali Temizleme Etkisi

DPPH (α,α -Diphenyl-b-picrylhydrazyl) serbest radikalini temizleme etkisi gruplar arasında quercetin'e göre karşılaştırıldığında 10 μ l çalışılan grupta D5 ve D6 kodlu maddelerin belirgin düzeyde serbest radikal temizleme etkisine sahip olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). D1, D2, D3, D4, D7, D8, D9, D10, D11 kodlu maddeler quercetin ile karşılaştırıldığında ise daha az etkinliğe sahip oldukları saptandı ($p<0,001$).

Konsantrasyondaki artışa bağlı olarak 20 μ l ve 30 μ l konsantrasyonla çalışılan gruplarda; D5, D6 ve D8 kodlu maddelerin DPPH serbest radikal temizleme etkisinde belirgin düzeyde artış olduğu saptanmasına rağmen ($p<0,0001$), D10 ve D11 kodlu maddelerdeki artışın daha az olduğu gözlemlendi ($p<0,001$).

D1, D2, D3, D4, D7, D9 kodlu maddelerde ise konsantrasyon artışına bağlı olarak DPPH serbest radikal temizleme etkisi quercetin'e göre karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalma olduğu saptandı ($p<0,0001$).



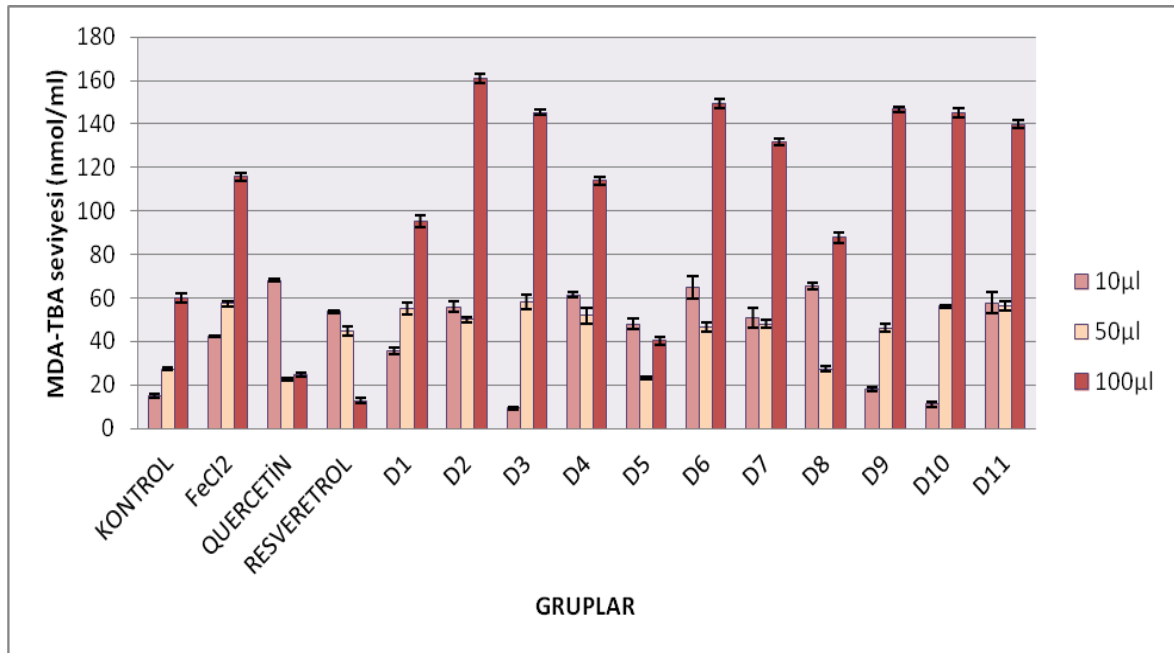
Şekil 3.1. Madde gruplarının DPPH radikali temizleme etkisi

3.2. Madde Gruplarının *In vitro* Ortamda Antioksidan Etkileri

Madde gruplarının *in vitro* ortamda LPO üzerine etkileri karşılaştırıldığında, 10 µl çalışılan grupta LPO miktarının kontrole göre D1, D2, D4, D5, D6, D7, D9, D11 kodlu madde gruplarında belirgin düzeyde arttığı saptandı ($p<0,0001$). D3 ve D2 kodlu madde gruplarında ise; kontrole göre LPO düzeylerinde azalma gözlemlendi ($p<0,001$). 50µl çalışılan gruplarda kontrole göre; FR grubu ile, D1, D2, D4, D10, ve D11 kodlu maddelerde miktarın belirgin düzeyde arttığı ($p<0,0001$), resveretrol ile D6, D7 ve D9 kodlu maddelerdeki artışın daha az olduğu saptandı ($p<0,001$). Quercetin ile D5 ve D8 kodlu maddelerde ise LPO miktarı kontrole göre kısmen azalırken ($p<0,05$), FR grubuna göre daha belirgin oranda azalmıştır ($p<0,001$).

100 µl mikrolitre çalışılan grupta kontrole göre; FR grubu ile, D2, D3, D6, D7, D9, D10 ve D11 kodlu madde gruplarında belirgin düzeyde artmasına rağmen ($p<0,0001$); D4, D1 ve D8 kodlu maddelerde LPO miktarındaki artışın daha az düzeyde olduğu saptandı ($p<0,001$).

Quercetin ve Resveretrol grupları ile D5 kodlu madde de ise, kontrol ve FR gruplarına göre karşılaştırıldığında; LPO miktarında önemli ölçüde azalma olduğu saptandı ($p<0,0001$).



Şekil 3.2. Madde gruplarının *in vitro* ortamda lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri

3.3. Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'de Glutasyon (GSH), Malondialdehit (MDA) ve Total Protein Sentezi Üzerine Etkisi

Tablo 3.1. D11, D2 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de glutasyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH), malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein(mg/g) sentezi üzerine etkisi

	Kontrol	D11	D2
GSH	1,42 $\pm$ 0,25	2,30 $\pm$ 0,32 ^d	1,71 $\pm$ 0,19 ^c
MDA	4,09 $\pm$ 0,37	5,22 $\pm$ 0,35 ^d	3,89 $\pm$ 0,34 ^c
Protein	5,92 $\pm$ 1,20	8,38 $\pm$ 1,36 ^d	8,79 $\pm$ 1,30 ^d

d:p<0.001, c: p<0.01, b: p<0.05, a: p>0.05

D11 ve D2 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de glutasyon miktarı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında her iki grupta da miktarının arttığı gözlemlendi. Kontrole kıyasla D11 kodlu maddedeki artışın ($p<0,001$), D2 kodlu maddedeki artışa ($p<0,01$) oranla daha daha yüksek düzeyde olduğu saptandı.

D11 ve D2 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de MDA miktarı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; D11 kodlu maddenin MDA miktarını belirgin düzeyde arttırdığı gözlenirken ($p<0,001$); D2 kodlu maddenin MDA miktarını düşürdüğü saptandı ($p<0,01$).

D11 ve D2 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de total protein miktarına etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında her iki grupta da artışın yüksek düzeyde olduğu saptandı ($p<0,001$).

Tablo 3.2. D4, D5, D10 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de glutasyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH), malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein(mg/g) sentezi üzerine etkisi

	Kontrol	D4	D5	D10
GSH	0,73 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,05 ^d	0,08 $\pm$ 0,05 ^d	0,01 $\pm$ 0,01 ^d
MDA	2,98 $\pm$ 0,30 ^a	3,20 $\pm$ 0,30 ^b	3,27 $\pm$ 0,30 ^b	2,97 $\pm$ 0,17 ^a
Protein	10,10 $\pm$ 1,04	7,65 $\pm$ 1,01 ^b	6,80 $\pm$ 0,78 ^c	13,76 $\pm$ 0,82 ^d

d:p<0.001, c: p<0.01, b: p<0.05, a: p>0.05

D4, D5, D10 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de glutatyon (GSH) miktarına etkisi, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, her üç grupta da miktarın belirgin bir düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$).

D4, D5, D10 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de MDA miktarına etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, D4 ile D5 kodlu maddelerin MDA miktarını kısmen arttırdığı gözlenirken ($p<0,05$), D10 kodlu maddenin istatistiksel bir farklılık göstermediği saptandı ($p>0,05$).

D4, D5 ve D10 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de total protein miktarına etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, D10 kodlu maddenin total protein miktarını belirgin düzeyde arttırmasına rağmen ($p<0,001$), D4 ve D5 kodlu maddelerin miktarı düşürdüğü saptandı. D4 kodlu madde total protein miktarını kısmen düşürürken ($p<0,05$), D5 kodlu maddenin total protein miktarını daha belirgin düzeyde düşürdüğü gözlemlendi ($p<0,01$).

Tablo 3.3. D3, D8, D9 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de glutatyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH) , malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein (mg/g) sentezi üzerine etkisi

	Kontrol	D8	D9	D3
GSH	0,36 $\pm$ 0,09 ^a	0,27 $\pm$ 0,03 ^b	0,37 $\pm$ 0,04 ^a	0,76 $\pm$ 0,04 ^b
MDA	3,70 $\pm$ 0,93 ^a	5,64 $\pm$ 1,00 ^d	3,71 $\pm$ 0,75 ^a	3,62 $\pm$ 0,42 ^a
Protein	8,59 $\pm$ 0,46	14,05 $\pm$ 0,53 ^{cd}	6,58 $\pm$ 0,03 ^b	10,67 $\pm$ 0,51 ^d

cd: $p<0,0001$ d: $p<0,001$ c: $p<0,01$ b: $p<0,05$ a: $p>0,05$

D3, D8, D9 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de glutatyon miktarı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, D9 kodlu maddenin istatistiksel bir farklılık göstermediği gözlenirken ($p>0,05$), D8 kodlu maddenin glutatyon miktarını kısmen azalttığı ($p<0,05$); D3 kodlu maddenin ise kısmen arttırdığı saptandı ($p<0,05$).

D3, D8 ve D9 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de MDA miktarına üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, D8 kodlu maddenin, miktarı belirgin düzeyde arttırdığı gözlenirken ($p<0,001$), D3 ve D9 kodlu maddelerin istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği saptandı ($p>0,05$).

D3, D8 ve D9 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de total protein miktarına etkisi, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; D3 kodlu maddenin miktarı arttırırken ($p<0,001$),

D8 kodlu maddenin daha belirgin düzeyde arttırdığı saptandı ($p<0,0001$). D9 kodlu maddenin ise total protein miktarını kısmen azalttığı saptandı ($p<0,05$).

Tablo 3.4. D1, D6, D7 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de glutasyon ($\mu\text{mol/g}$ pellet) (GSH), malondialdehit (nmol/g pellet) (MDA) ve total protein(mg/g) sentezi üzerine etkisi

	Kontrol	D1	D6	D7
GSH	2,34 $\pm$ 0,35	0,90 $\pm$ 0,31 ^d	0,63 $\pm$ 0,10 ^d	0,85 $\pm$ 0,10 ^d
MDA	3,68 $\pm$ 0,09 ^a	6,92 $\pm$ 1,03 ^{cd}	4,32 $\pm$ 0,13 ^d	3,70 $\pm$ 0,09 ^a
Protein	5,17 $\pm$ 0,82	7,83 $\pm$ 1,39 ^d	9,48 $\pm$ 1,47 ^d	10,73 $\pm$ 1,19 ^d

cd: $p<0,0001$ d: $p<0,001$ c: $p<0,01$ b: $p<0,05$ a: $p>0,05$

D1, D6, D7 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de GSH miktarı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm gruplarda miktarın belirgin düzeyde azaldığı saptandı ($p<0,001$).

D1, D6, D7 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de MDA miktarına etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, D6 kodlu maddenin miktarı arttırdığı ($p<0,001$); D1 kodlu maddenin ise daha belirgin düzeyde arttırdığı saptandı ($p<0,0001$). D7 kodlu maddenin ise istatistiksel bir farklılık göstermediği gözlemlendi ($p>0,005$).

D1, D6, D7 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de total protein miktarı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; tüm gruplarda miktarın belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0,001$).

3.4. D4, D5, D10 Kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi

D4, D5, D10 kodlu maddelerin *S. cerevisiae* mayasının yağ asidi profili üzerine etkisi incelendiğinde laurik asit (12:0) miktarının kontrole göre; D5 ve D10 kodlu maddelerde kısmen azaldığı ($p<0,05$); ve bu azalmanın D5 kodlu maddede daha belirgin olduğu saptandı ($p<0,01$). D10 kodlu madde de ise kısmen bir artış olduğu saptandı ($p<0,05$).

Tablo 3.5. D4, D5, D10 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae* 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g}/\text{g}$)

Yağ asitleri	Kontrol	D4	D5	D10
12:0	34,73 $\pm$ 1,83 ^a	35,79 $\pm$ 0,97 ^a	14,50 $\pm$ 2,41 ^c	27,96 $\pm$ 1,69 ^b
16:0	191,65 $\pm$ 11,57	230,82 $\pm$ 11,50 ^d	273,29 $\pm$ 11,49 ^{cd}	233,01 $\pm$ 11,58 ^d
16:1	223,98 $\pm$ 10,54	96,50 $\pm$ 10,23 ^{cd}	122,45 $\pm$ 10,66 ^d	128,78 $\pm$ 10,42 ^d
18:0	62,14 $\pm$ 1,93	76,06 $\pm$ 1,33 ^c	87,95 $\pm$ 1,74 ^d	66,63 $\pm$ 1,16 ^b
18:1n9t	86,56 $\pm$ 0,68	158,22 $\pm$ 0,78 ^d	160,47 $\pm$ 0,59 ^d	169,82 $\pm$ 0,81 ^{cd}
18:1n9	35,55 $\pm$ 10,7 ^a	35,35 $\pm$ 10,29 ^a	63,40 $\pm$ 10,72 ^d	32,32 $\pm$ 10,67 ^b
18:2n6c	10,74 $\pm$ 0,02 ^a	10,28 $\pm$ 0,07 ^a	12,79 $\pm$ 0,89 ^b	13,02 $\pm$ 0,14 ^b

cd: p<0.0001 d: p<0.001 c: p<0.01 b: p<0.05 a: p>0.05

Palmitik asit (16:0) miktarının kontrole göre her üç grupta da belirgin düzeyde arttığı (p<0,001); bu artışın D5 kodlu madde de daha belirgin olduğu saptandı (p<0,0001). Sitearik asit (18:0) miktarının kontrole göre, her üç grupta da arttığı, en belirgin düzeydeki artışın D5 kodlu maddede olduğu saptandı (p<0,001).

Palmitoleik asit (16:1) miktarının kontrole göre her üç grupta da belirgin düzeyde azaldığı, (p<0,001); en fazla azalmanın D4 kodlu madde de olduğu saptandı (p<0,0001). Elaidik asid ((18:1) n9t) miktarının kontrole göre her üç grupta da arttığı (p<0,01), en fazla artışın, D10 kodlu madde de olduğu saptandı (p<0,0001).

Oleik asid ((18:1)n9) miktarının kontrole göre; D5 kodlu maddede belirgin düzeyde arttığı gözlenmesine rağmen (p<0,01); D10 kodlu maddede kısmen azaldığı (p<0,05), D4 kodlu madde de ise istatistiksel bir farklılığın bulunmadığı saptandı (p>0,05).

Linoleik asid ((18:2)6nc) miktarının kontrole göre; D5 ve D10 kodlu maddelerde kısmen arttığı saptanırken (p<0,05); D4 kodlu maddede istatistiksel olarak bir farklılığın bulunmadığı saptandı (p>0,05).

3.5. D2 ve D11 kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi

Tablo 3.6. D2, D11 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae* 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g}/\text{lg}$)

Yağ asitleri	Kontrol	D2	D11
16:0	80,39 $\pm$ 10,82	85,49 $\pm$ 10,75 ^c	85,49 $\pm$ 10,75 ^c
16:1	95,53 $\pm$ 9,43	121,72 $\pm$ 9,32 ^d	156,98 $\pm$ 9,92 ^{cd}
18:0	20,73 $\pm$ 0,56 ^a	17,18 $\pm$ 0,57 ^b	20,52 $\pm$ 0,21 ^a
18:1n9	45,83 $\pm$ 0,04 ^a	45,41 $\pm$ 0,05 ^a	61,50 $\pm$ 0,06 ^c
20:0	10,42 $\pm$ 0,15 ^a	10,41 $\pm$ 0,37 ^a	5,15 $\pm$ 0,17 ^c

cd: $p < 0.0001$ d: $p < 0.001$ c: $p < 0.01$ b: $p < 0.05$ a: $p > 0.05$

D2 ve D11 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'nin yağ asidi profili üzerine etkisi incelendiğinde palmitik asit (16:0) miktarının kontrole göre; her iki grupta da kısmen arttığı gözlemlendi ($p < 0,01$).

Palmitoleik asit (16:1) miktarının kontrole göre; D11 kodlu maddede belirgin düzeyde arttığı saptanırken ($p < 0,0001$); D2 kodlu maddedeki artışın daha az düzeyde olduğu saptandı ($p < 0,001$).

Sitearik asit (18:0) miktarının kontrole göre; D2 kodlu madde de kısmen azaldığı saptanırken ($p < 0,05$); D11 kodlu maddede istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$).

Oleik asit miktarında ((18:1)n9) kontrole göre; D11 kodlu maddede kısmen bir artış olduğu ($p < 0,01$); D2 kodlu maddede ise istatistiksel olarak bir farklılığın bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$).

Araşidik asit (20:0) miktarının kontrole göre; D11 kodlu maddede kısmen azaldığı saptanırken ($p < 0,01$); D2 kodlu maddede istatistiksel olarak bir farklılığın bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$).

3.6. D3, D8, D9 Kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae* 'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi

Tablo 3.7. D8, D9, D3 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae* 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g/lg}$)

Yağ asitleri	Kontrol	D8	D9	D3
12:0	49,49 $\pm$ 2,5	28,16 $\pm$ 2,09 ^c	25,85 $\pm$ 2,01 ^c	0
14:0	95,39 $\pm$ 2,48	104,26 $\pm$ 2,84 ^b	106,51 $\pm$ 2,05 ^b	44,03 $\pm$ 2,42 ^d
15:0	71,15 $\pm$ 2,22	63,14 $\pm$ 1,04 ^c	69,99 $\pm$ 1,81 ^c	31,87 $\pm$ 1,09 ^d
16:0	458,04 $\pm$ 4,40	543,83 $\pm$ 4,53 ^{cd}	554,20 $\pm$ 4,55 ^{cd}	272,08 $\pm$ 4,43 ^{cd}
16:1	160,49 $\pm$ 4,41	280,23 $\pm$ 2,73 ^{cd}	286,99 $\pm$ 2,78 ^{cd}	215,52 $\pm$ 2,91 ^{cd}
17:1	138,34 $\pm$ 21,47	121,40 $\pm$ 21,32 ^b	129,88 $\pm$ 22,04 ^b	60,98 $\pm$ 21,06 ^{cd}
18:0	80,44 $\pm$ 12,77 ^a	86,92 $\pm$ 12,92 ^b	80,91 $\pm$ 12,81 ^a	43,24 $\pm$ 12,62 ^{cd}
18:1n9t	172,71 $\pm$ 11,65	264,24 $\pm$ 12,58 ^{cd}	259,32 $\pm$ 12,92 ^{cd}	121,42 $\pm$ 11,65 ^{cd}
18:1n9	72,49 $\pm$ 2,31 ^a	48,52 $\pm$ 2,60 ^d	75,39 $\pm$ 2,19 ^a	38,35 $\pm$ 2,45 ^{cd}
18:2n6c	140,14 $\pm$ 20,63	148,41 $\pm$ 21,33 ^b	166,30 $\pm$ 21,38 ^d	97,89 $\pm$ 22,03 ^{cd}
18:2n6t	40,32 $\pm$ 12,57 ^a	44,24 $\pm$ 9,77 ^a	44,27 $\pm$ 9,17 ^a	42,42 $\pm$ 9,70 ^a

cd: $p < 0.0001$ d: $p < 0.001$ c: $p < 0.01$ b: $p < 0.05$ a: $p > 0.05$

D3, D8, D9 kodlu maddelerin *S. cerevisiae* 'nin yağ asidi profili üzerine etkisi incelendiğinde laurik asit (12:0) miktarının kontrole göre; D8 ve D9 kodlu maddelerde azaldığı saptandı ($p < 0,01$).

Miristik asit (14:0) miktarının kontrole göre; D8 ve D9 kodlu maddelerde kısmen arttığı gözlenirken ($p < 0,05$); D3 kodlu maddede belirgin düzeyde azalmanın olduğu saptandı ($p < 0,001$).

(15:0) miktarının kontrole göre tüm gruplarda kısmen azaldığı saptanırken ($p < 0,01$), gruplar arasındaki en fazla azalmanın D3 kodlu madde de olduğu saptandı ($p < 0,001$).

Palmitik asit (16:0) miktarının kontrole göre D8 ve D9 kodlu maddelerde belirgin düzeyde arttığı ($p < 0,0001$); D3 kodlu maddede ise belirgin düzeyde azalma olduğu saptandı ($p < 0,0001$).

Sitearik asit (18:0) miktarının kontrole göre D8 kodlu maddede kısmen arttığı halde ($p < 0,005$); D3 kodlu maddede belirgin bir düzeyde azalma olduğu saptandı ($p < 0,0001$). D9 kodlu maddede ise istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$).

Palmitoleik asit(16:1) miktarının kontrole göre; tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı ($p<0,001$); gruplar arasındaki en büyük artışın D9 kodlu maddede olduğu saptandı ($p<0,0001$).

(17:1) miktarının kontrole göre tüm gruplarda kısmen azaldığı ($p<0,05$); gruplar arasında en belirgin azalmanın D3 kodlu maddede olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Elaidik asit((18:1)n9t) miktarının kontrole göre D8 ve D9 kodlu maddelerde belirgin düzeyde arttığına saptanmasına rağmen ($p<0,0001$); D3 kodlu maddede belirgin düzeyde bir azalmanın olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Oleik asit((18:1)n9c) miktarında kontrole göre; D3 ve D8 kodlu maddelerde belirgin bir düzeyde azalmanın gözlenmesine rağmen ($p<0,001$); D9 kodlu maddede kısmen bir azalmanın olduğu saptandı ($p<0,05$).

Linoleik asit((18:2)n6c) miktarında D8 ve D9 kodlu maddelerde kontrole göre artış olduğu; artışın D9 kodlu maddede daha belirgin olduğu saptandı ($p<0,001$). D3 kodlu maddede ise kontrole göre önemli düzeyde bir azalmanın olduğu saptandı ($p<0,0001$).

((18:2)n6t) miktarının D8 ve D9 kodlu maddelerde kontrole göre kısmen arttığı saptanmasına rağmen ($p<0,05$); D3 kodlu maddede kısmen azaldığı saptandı ($p<0,05$).

3.7. D1 ve D6 Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi

D1 ve D6 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'nin yağ asidi profili üzerine etkisi incelendiğinde Laurik asit (12:0) miktarının D6 kodlu maddede azaldığı ($p<0,001$); D1 kodlu maddede ise istatistiksel bir farklılığın bulunmadığı saptandı. ($p>0,05$).

Palmitik asit (16:0) miktarında kontrole göre; D1 kodlu maddede belirgin düzeyde artış olduğu saptanmasına rağmen ($p<0,001$); D6 kodlu madde de kısmen bir artış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Palmitoleik asit (16:1) miktarı kontrole göre karşılaştırıldığında D1 kodlu maddede belirgin düzeyde artış olduğu saptanırken ($p<0,0001$); D6 kodlu maddedeki artışın daha az oranda olduğu saptandı ($p<0,001$).

Oleik asit (18:1n9) miktarı kontrole göre karşılaştırıldığında D1 kodlu maddede artış olduğu saptanırken ($p<0,01$); D6 kodlu maddede belirgin düzeyde azalma olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Stearik asit (18:0) ve araşidik asit (20:0) miktarının kontrole göre; D6 kodlu maddede arttığı ($p<0,001$); artışın D1 kodlu maddede daha belirgin düzeyde olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Docosaenoik asit (22:1) ve Docosadienoic asit (22:2) miktarları kontrole göre her iki grupta da artarken ($p<0,001$); artışın D6 kodlu maddede daha belirgin düzeyde olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Tablo 3.8. D1, D6 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'nin yağ asidi profili üzerine etkisi($\mu\text{g}/1\text{g}$)

Yağ Asitleri	Kontrol	D1	D6
12:0	20,80 $\pm$ 1,33 ^a	20,52 $\pm$ 1,53 ^a	14,19 $\pm$ 0,95 ^c
16:0	122,95 $\pm$ 2,29	189,16 $\pm$ 2,59 ^d	128,48 $\pm$ 2,76 ^b
16:1	40,10 $\pm$ 1,44	244,43 $\pm$ 1,52 ^{cd}	58,96 $\pm$ 1,63 ^d
18:0	35,80 $\pm$ 1,93	53,68 $\pm$ 1,96 ^{cd}	41,60 $\pm$ 1,50 ^d
18:1n9	80,67 $\pm$ 1,52	88,38 $\pm$ 1,74 ^b	58,86 $\pm$ 1,60 ^{cd}
20:0	6,94 $\pm$ 1,11	14,91 $\pm$ 0,97 ^{cd}	12,76 $\pm$ 0,57 ^d
22:1	246,21 $\pm$ 3,11	347,19 $\pm$ 3,42 ^d	381,10 $\pm$ 4,03 ^{cd}
22:2	30,16 $\pm$ 1,07	49,08 $\pm$ 1,29 ^d	50,18 $\pm$ 1,46 ^d

cd: $p<0,0001$ d: $p<0,001$ c: $p<0,01$ b: $p<0,05$ a: $p>0,05$

3.8. D2 ve D11 Kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'nin Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi

D11 kodlu maddenin *S. cerevisiae*'nin lipofilik vitaminler ile fitositerol profili üzerine etkisi incelendiğinde; α tokoferol, stigmasterol, β -sitosterol miktarlarının kontrole

göre önemli ölçüde azaldığı saptanırken ($p<0,0001$); α tokoferol ve stigmasterol vitaminindeki azalmanın daha düşük oranda olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Tablo 3.9. D11, D2 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi

Vitaminler	Kontrol	D11	D2
α -tokoferol	5,25±0,46	0,70±0,10 ^{cd}	2,88±1,02 ^d
δ -tokoferol	0,90±0,25	0,80±0,29 ^b	0,53±0,33 ^c
D2 vitamini	1,60±0,51	0,68±1,03 ^b	0,65±0,78 ^c
K1 vitamini	0,12±0,08	0,35±0,07 ^c	0,16±0,06 ^b
K2 vitamini	0,90±0,56 ^a	0,91±0,24 ^a	0,78±0,24 ^c
Ergosterol	4,09±1,11	13,71±1,40 ^{cd}	9,62±1,44 ^d
Stigmasterol	426,59±11,46	250,62±11,40 ^{cd}	376,25±11,60 ^d
β -sitosterol	2,20±0,31	0,38±0,34 ^{cd}	0,64±0,76 ^d

cd: $p<0,0001$ d: $p<0,001$ c: $p<0,01$ b: $p<0,05$ a: $p>0,05$

D11 kodlu maddede kontrole göre; K₂ vitamin düzeyi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığı ($p>0,05$); buna karşılık K1 vitamini ve ergosterol düzeylerinde artış olduğu ve bu artışın ergosterol miktarında çok daha belirgin düzeyde olduğu saptandı ($p<0,0001$).

D2 kodlu maddenin *S. cerevisiae*'nin lipofilik vitaminler ile fitosterol profili üzerine etkisi incelendiğinde; α tokoferol , δ -tokoferol, D₂ vitamini, K₂ vitamini, stigmasterol ve β -sitosterol miktarında kontrole göre azalma olduğu ($p<0,05$) ve bu azalmanın α -tokoferol ve stigmasterol miktarında daha belirgin düzeyde olduğu saptandı ($p<0,0001$). D2 kodlu maddenin K₁ vitamin miktarını kontrole göre kısmen arttırdığı gözlemlendi ($p<0,05$).

D2 ve D11 kodlu maddeler grupları arası karşılaştırıldığında ise D2 kodlu maddenin D11 kodlu maddeye göre δ -tokoferol, D₂ vitamini, K₂ vitamin düzeylerini daha belirgin oranda azaltmasına rağmen ($p<0,01$); α -tokoferol, stigmasterol , β -sitosterol düzeylerinde kısmen bir azalmanın olduğu saptandı ($p<0,05$). Ergosterol miktarı kontrole göre gruplar arasında karşılaştırıldığında; D11 deki artışın daha belirgin olduğu saptandı.

3.9. D4, D5, D10 Kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'de Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi

D4, D5, D10 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de lipofilik vitaminler ile fitosterol profili üzerine etkisi incelendiğinde α - tokoferol, δ - tokoferol, K₁ vitamini ve Stigmasterol miktarlarının kontrole göre, tüm gruplarda arttığı saptandı. α - tokoferol vitamin miktarında kontrole göre en fazla artışın D5 kodlu maddede olmasına karşılık ($p<0,0001$); D10 kodlu madde de daha az oranda artış olduğu saptandı ($p<0,001$).

δ - tokoferol miktarındaki en belirgin artışın D10 kodlu maddede olduğu halde ($p<0,01$); D4 ve D5 kodlu maddelerde nispeten daha az düzeyde artış olduğu saptandı ($p<0,05$).

K₁ vitamini için en fazla artışın D5 kodlu madde de olduğu gözlenmesine rağmen ($p<0,0001$); D4 ve D10 kodlu madde gruplarında kısmen bir artış olduğu saptandı ($p<0,01$).

Stigmasterol için D4 ve D5 kodlu maddelerde artış gözlenirken ($p<0,001$); en fazla artışın D10 kodlu madde olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Ergosterol ve β -sitosterol miktarları kontrole göre karşılaştırıldığında D4 kodlu maddede istatistiksel olarak bir farklılığın bulunmadığı saptanırken ($p>0,05$); D5 kodlu maddenin ergosterol miktarını azalttığı ($p<0,05$) ve D10 kodlu maddenin ergosterol miktarını belirgin düzeyde arttırdığı saptandı ($p<0,0001$). β -sitosterol için; D5 kodlu maddenin miktarı belirgin düzeyde arttırdığı saptanırken ($p<0,001$); D10 kodlu maddenin kısmen arttırdığı belirlendi ($p<0,05$).

D₂ vitamin miktarının kontrole göre; D4 ve D5 kodlu maddelerde arttığı, en belirgin düzeydeki artışın D4 kodlu madde de olduğu saptandı ($p<0,01$); D10 kodlu maddede ise kontrole göre belirgin düzeyde azalma olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$).

Tablo 3.10. D4, D5, D10 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi

Vitaminler	Kontrol	D4	D5	D10
α - tokoferol	2,85 $\pm$ 1,51	5,32 $\pm$ 0,82 ^c	14,61 $\pm$ 1,33 ^{cd}	7,90 $\pm$ 1,36 ^d
δ - tokoferol	0,79 $\pm$ 0,33	0,89 $\pm$ 0,24 ^b	0,89 $\pm$ 0,19 ^b	1,02 $\pm$ 0,34 ^c
D2 vitamini	1,28 $\pm$ 0,78	1,81 $\pm$ 0,39 ^c	1,66 $\pm$ 0,60 ^b	0,25 $\pm$ 0,34 ^{cd}
K1 vitamini	0,16 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,34 ^c	0,60 $\pm$ 0,48 ^{cd}	0,47 $\pm$ 0,32 ^c
K2 vitamini	0,49 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,09 ^d	0,08 $\pm$ 0,07 ^{cd}	0,56 $\pm$ 0,07 ^b
Ergosterol	3,23 $\pm$ 0,88 ^a	3,25 $\pm$ 1,22 ^a	2,72 $\pm$ 0,44 ^d	5,68 $\pm$ 1,40 ^{cd}
Stigmasterol	198,40 $\pm$ 11,22	240,86 $\pm$ 11,41 ^d	246,16 $\pm$ 11,12 ^d	320,22 $\pm$ 11,96 ^{cd}
β -sitosterol	0,52 $\pm$ 0,37 ^a	0,51 $\pm$ 0,22 ^a	1,23 $\pm$ 0,87 ^d	0,83 $\pm$ 0,59 ^b

cd: $p<0,0001$ d: $p<0,001$ c: $p<0,01$ b: $p<0,05$ a: $p>0,05$

3.10. D8, D9, D3 Kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'de Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi

D8, D9, D3 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*' de lipofilik vitaminler ile fitosterol profili üzerine etkisi incelendiğinde α -tokoferol, K₁ vitamini ve Stigmasterol düzeyinin kontrol grubuna göre tüm gruplarda arttığı gözlemlendi. α -tokoferol ve stigmasterol miktarındaki en belirgin düzeydeki artışın D8 kodlu madde olduğu ($p<0,0001$); K₁ vitaminindeki en belirgin düzeydeki artışın ise D9 kodlu maddede olduğu saptandı ($p<0,0001$).

Ergosterol ve K₂ vitamini kontrole göre karşılaştırıldığında D8 ve D9 kodlu madde gruplarında kısmen arttığı halde ($p<0,05$); D3 kodlu madde grubunda azaldığı saptandı ($p<0,01$). Ergosterol miktarındaki en belirgin artışın D9 kodlu madde grubunda olduğu gözlenirken ($p<0,0001$), K₂ vitaminindeki en belirgin artışın D8 kodlu madde de olduğu saptandı ($p<0,05$).

δ -tokoferol ve β -sitosterol miktarı kontrole göre karşılaştırıldığında; tüm gruplarda azaldığı saptandı ($p<0,01$).

D₂ vitamini kontrole göre karşılaştırıldığında; D8 ve D9 kodlu maddelerde kısmen artış olduğu halde ($p<0,05$); D3 kodlu madde de kısmen azalma olduğu saptandı ($p<0,05$).

Tablo 3.11. D8, D9, D3 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae*'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi

Vitaminler	Kontrol	D8	D9	D3
α -tokoferol	1,59 $\pm$ 0,26	6,53 $\pm$ 0,07 ^{cd}	3,17 $\pm$ 0,18 ^d	2,46 $\pm$ 0,14 ^d
δ -tokoferol	0,38 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,10 ^c	0,16 $\pm$ 0,20 ^c	0,10 $\pm$ 0,10 ^c
D2 vitamini	0,02 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,12 ^b	0,09 $\pm$ 0,13 ^b	0,01 $\pm$ 0,00 ^b
K1 vitamini	0,22 $\pm$ 0,15	0,37 $\pm$ 0,11 ^b	0,42 $\pm$ 0,16 ^c	0,36 $\pm$ 0,16 ^b
K2 vitamini	1,15 $\pm$ 0,45	1,30 $\pm$ 0,26 ^b	1,22 $\pm$ 0,25 ^b	0,56 $\pm$ 0,46 ^c
Ergosterol	10,25 $\pm$ 0,24	12,09 $\pm$ 1,17 ^b	15,75 $\pm$ 1,38 ^{cd}	8,58 $\pm$ 1,35 ^c
Stigmasterol	525,61 $\pm$ 11,71	917,93 $\pm$ 11,11 ^{cd}	849,76 $\pm$ 11,41 ^{cd}	535,51 $\pm$ 11,11 ^b
β -sitosterol	0,96 $\pm$ 0,21	0,31 $\pm$ 0,54 ^c	0,31 $\pm$ 0,29 ^c	0,49 $\pm$ 0,34 ^c

cd: $p<0,0001$ d: $p<0,001$ c: $p<0,01$ b: $p<0,05$ a: $p>0,05$

3.11. D1ve D6 Kodlu Madde Gruplarının *S. cerevisiae*'de Lipofilik Vitaminler ile Fitosterol Profili Üzerine Etkisi

D1ve D6 kodlu maddelerin *S. cerevisiae*'de, lipofilik vitaminler ile fitosterol profili üzerine etksi incelendiğinde; α -tokoferol ve β -sitosterol düzeylerinin her iki grupta da kontrol grubuna göre arttığı saptandı ($p<0,0001$). α -tokoferoldeki en belirgin düzeydeki artışın D1 kodlu maddede olmasına karşılık; β -sitosterol miktarındaki en belirgin düzeydeki artışın D6 kodlu maddede olduğu saptandı ($p<0,001$).

K₁ ve K₂ vitamin miktarı kontrole göre karşılaştırıldığın da her iki grupta da azalma olduğu ($p<0,05$) ve bu azalmanın D6 kodlu madde de daha belirgin olduğu saptandı ($p<0,01$).

D₂ vitamini, δ -tokoferol ergosterol ve stigmasterol düzeyleri kontrole göre karşılaştırıldığında; D1 kodlu madde grubunda kontrole göre artış gözlenirken ($p<0,001$); D6 kodlu madde de azalma olduğu saptandı ($p<0,001$).

Tablo 3.12. D1, D6 kodlu madde gruplarının *S. cerevisiae* 'de lipofilik vitaminler ile fitosteroller üzerine etkisi

Vitaminler	Kontrol	D1	D6
α -tokoferol	13,96 $\pm$ 1,36	27,34 $\pm$ 1,13 ^{cd}	15,82 $\pm$ 1,42 ^d
δ -tokoferol	0,14 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,10 ^d	0,11 $\pm$ 0,15 ^b
D2 vitamini	0,59 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,13 ^d	0,16 $\pm$ 0,33 ^d
K1 vitamini	0,22 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,13 ^b	0,11 $\pm$ 0,08 ^c
K2 vitamini	0,22 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,13 ^b	0,11 $\pm$ 0,08 ^c
Ergosterol	3,76 $\pm$ 0,52	5,93 $\pm$ 0,45 ^{cd}	3,19 $\pm$ 0,54 ^d
Stigmasterol	274,11 $\pm$ 2,09	382,27 $\pm$ 2,49 ^{cd}	182,55 $\pm$ 2,02 ^{cd}
β -sitosterol	0,46 $\pm$ 0,10	0,65 $\pm$ 0,10 ^c	0,99 $\pm$ 0,17 ^d

cd: $p<0.0001$ d: $p<0.001$ c: $p<0.01$ b: $p<0.05$ a: $p>0.05$

4. TARTIŞMA

Organik kimya uzun yıllara kadar canlı varlıkların yapısındaki bileşiklerin kimyasal yapısını aydınlatan bilim dalı olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda birçok yeni organik bileşik laboratuvarında sentezlenmeye başlanmıştır. Sentezlenen bu bileşiklerin birçoğunun canlı organizmaların yapısında bulunan moleküllere benzerlikleri vardır.

Günümüzde özellikle organik sentezlerde biyolojik aktiviteye sahip yeni polifonksiyonel bileşiklerin sentezi çok büyük önem taşımaktadır. Hem doğal hem de sentetik olarak elde edilebilen kalkonlar; kimyasal olarak üçlü bir α,β -doymamış karbonil grubuna katılan iki aromatik halka içinde açık uçlu flavonoid benzeri yapılardır. Bu yüzden, son yıllarda kalkon ve türevleri yoğun bir ilgi odağı olmuş ve özellikle biyolojik aktiviteleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Kalkon türevleri, flavonoidlerin heterosiklik C halkasına sahip olmayan üyelerinden biridir. Flavonoidlerin temel yapısındaki propan zinciri üzerinde α,β -doymamış karbonil grubunun bulunması yani bir çift bağ ve bir keton grubunun yer alması kalkonları ortaya çıkarır. Kalkon ifadesi 1,3-diaril-2-propen-1-on yapısı içeren bütün bileşikler için kullanılır [4].

Doğal ya da sentetik bileşikler olan kalkonlar flavonoid ailesine üye bileşiklerdir ve geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler [4]. Kalkonların, karsinogenezin gelişimini engelleyen ve dokularda iyileştirici etki gösteren anti kanser ajanlarının bir sınıfı olduğu ileri sürülmüştür. Yenilebilir bitkilerde bol olan flavonoid ve izoflavonoidlerin öncüsü olan moleküller gibidir [5]. Yapılan çalışmalarda kalkonların; antikanser [6], antienflamatuar [7], antiinvasiv, antitüberküloz ve antifungal [5], aktivite gösterdiği görülmektedir. Bunların yanı sıra; antioksidant, antimalarial, antileishmanyal ve antitümör ajanı oldukları da rapor edilmiştir [196]. Bazı kalkon ve flavonoid türevlerinin anti-HIV aktivitesi gösterdiği de belirtilmiştir [196]. Kalkonlar, flavonlar gibi doğal olarak oluşan birçok pigmentin iyi bilinen öncüleridirler.

Biyolojik olarak kullanıldıkları kadar polimerlerde UV-absorbsiyon filtreleri olarak farklı türdeki optik materyallerde, yiyecek endüstrisinde, holografik kayıt teknolojileri gibi birçok uygulama alanında da kullanılırlar [8]. Bir ketovinil grubuna sahip çok sayıda bileşiğin önemli derecede biyolojik aktivite gösterdiği iyi bilinen bir gerçektir [197]. Kalkonlar da ketovinil grubu içeren bileşikler arasındadır ve gösterdikleri biyolojik aktiviteden dolayı kalkonlar üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

Lin vd [10], bir dizi kalkon ve flavonoid türevinin öldürücü ve bulaşıcı bir hastalık olan tüberküloza karşı aktivitelerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonunda iki kalkon türevinin ve dört kalkon tipi bileşiğin tüberküloz bakterisine karşı % 90'ın üzerinde inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Nakamura vd [11], florlanmış 3,4-dihidroksikalkonlar üzerinde yaptıkları çalışmada, kalkonların antiperoksidasyon ve *in vitro* (bir test tüpü içerisinde) şartlarda antitümör olarak biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu kalkonların fare bazofilik lösemi-1 hücreleri (RBL- 1) üzerinde 5-lipoksigenaz inhibisyonu ve fare karaciğer mikrozomlarında Fe^{3+} -ADP indüklenmiş NADPH-bağımlı lipid peroksidasyon üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca 6-fluoro-3,4-dihidroksi-2',4'-dimetoksikalkonun kullanılan bir insan kanser hücre kültürü paneli (HCC paneli) üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür.

Kalkonların pek çok faydalı özellikleri yanı sıra sitotoksik etkileri de bulunmaktadır. Nam vd [12], bir dizi 2',5'-dihidroksikalkon türevlerinin tümör hücre kültürlerine (B16 fare cilt tümörü, HCT 116 insan kalın bağırsak kanseri, A31 insan epitelium tümörü) karşı ve insan göbeğine ait damarlı endotel hücrelerine (HUVEC) karşı sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. İncelenen kalkon türevleri arasından birkaç molekülün, düşük mikromolarda IC50 değerleri ile yalnızca tümör hücre kültürlerine karşı değil endotel hücre kültürü HUVEC'e karşı da belirgin sitotoksik seçicilik gösterdiği rapor edilmiştir. Yeni kan damarlarının endotel hücrelerinden oluşumu (anjyogenez) katı tümör gelişmesinin bir ön koşuludur, anjyogenezin inhibisyonu gelişmeyi ve kanserli tümörleri çoğalmasını sınırlandıracaktır. Bu sonuçlara dayanarak Nam vd [12], kalkonların potansiyel anjyogenez inhibitörü olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bu yüzden, bu çalışmada furan halkası içeren kalkon türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı. Ayrıca, kalkonların yapılarında α,β -doymamış sistem içermeleri onları kimyasal olarak da önemli kılmaktadır ve çok sayıda hetero halkalı bileşiğin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılmaktadırlar.

Sentezlenmiş olan benzofuran türevi bileşiklerin *in vitro* serbest radikal temizleme etkisi ve *in vitro* lipid peroksidasyonu (LPO) üzerine olan etkileri ile; *Saccharomyces cerevisiae*'deki glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), total protein miktarı üzerine etkisi ile vitamin ve yağ asidi sentezi üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

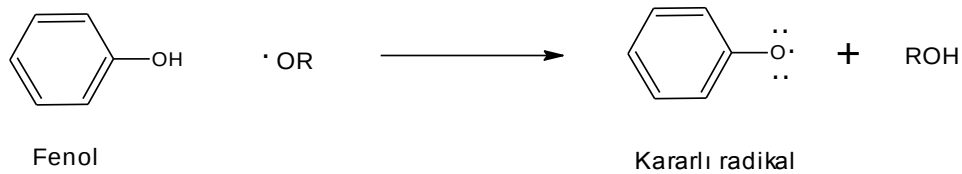
4.1. Benzofuran Türevi Organik Maddelerin *In vitro* Ortamda Etkileri

Bulgularımıza göre; organik maddelerin DPPH serbest radikal temizleme etkisi karşılaştırıldığında; D5 ve D6 kodlu maddelerin diğer maddelere göre oldukça belirgin oranda radikal temizle etkisinin olduğu belirlendi. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak bu grupların etkinliği karşılaştırıldığında ise; D5, D6 ve D8 kodlu maddelerin DPPH serbest radikal temizleme etkisinde belirgin düzeyde artış olduğu saptandı. Yapılan birçok çalışmada benzofuran türevi bileşiklerin antioksidan özeliğinin olduğu belirlenmiştir. Grisar vd. [30] ile Bindoli vd. [31], benzofuran türevi bileşiklerin lipid peroksidasyonu sonucu oluşan oksidanları ve sülfhidril grup oksidanlarıyla etkileşerek bu oksidanları yok ettiği ve dolayısıyla antioksidan olduğunu yapmış oldukları araştırmalarda belirtmişlerdir. Organik maddelerin antioksidan olma özelliği içerdiği OH· gruplarının sayısı ve yerleşim merkezleri ile yakından ilgilidir. OH· grubunun fazla olması antiradikal etkinliği arttıran başlıca etkindir. Çünkü OH· grubundaki hidrojen donör olarak görev almakta ve başta hidroksil, peroksil ve peroksinitrit olmak üzere radikalleri kararlı hale getirmektedir.

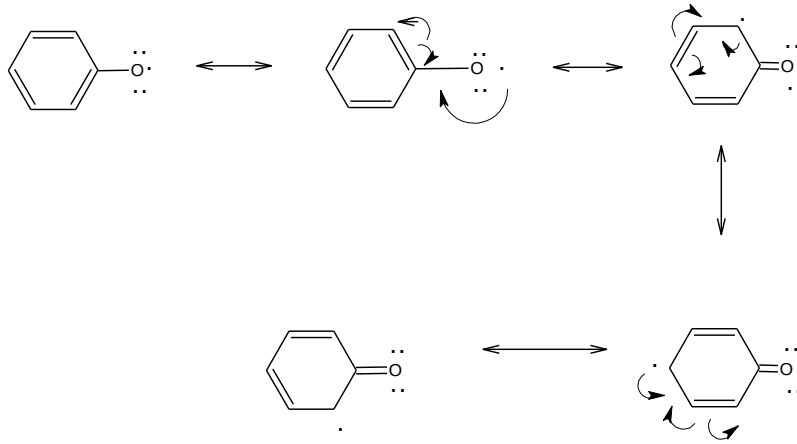
D1, D2, D3, D4, D7, D9, D10 kodlu maddelerde ise konsantrasyon artışına bağlı olarak DPPH serbest radikal temizleme etkisinde önemli ölçüde azalma olduğu saptandı.

Bir serbest radikal inhibitörü radikalik tepkimeyi durdurur. Bir inhibitör bazen serbest radikal tuzağı olarak tanımlanır. Bir serbest radikal inhibitörü, etkin radikallerle tepkimeye girerek göreceli kararlı ve etkin olmayan radikalleri oluşturur.

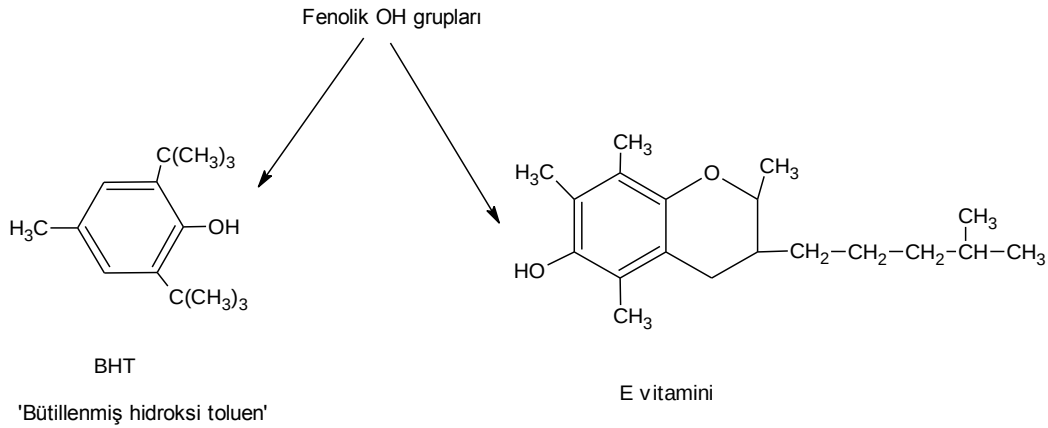
Otooksidasyonunu kontrol etmek için kullanılan inhibitörlere antioksidan ya da gıda endüstrisinde koruyucu madde denir. Aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren fenoller, etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir. Bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.



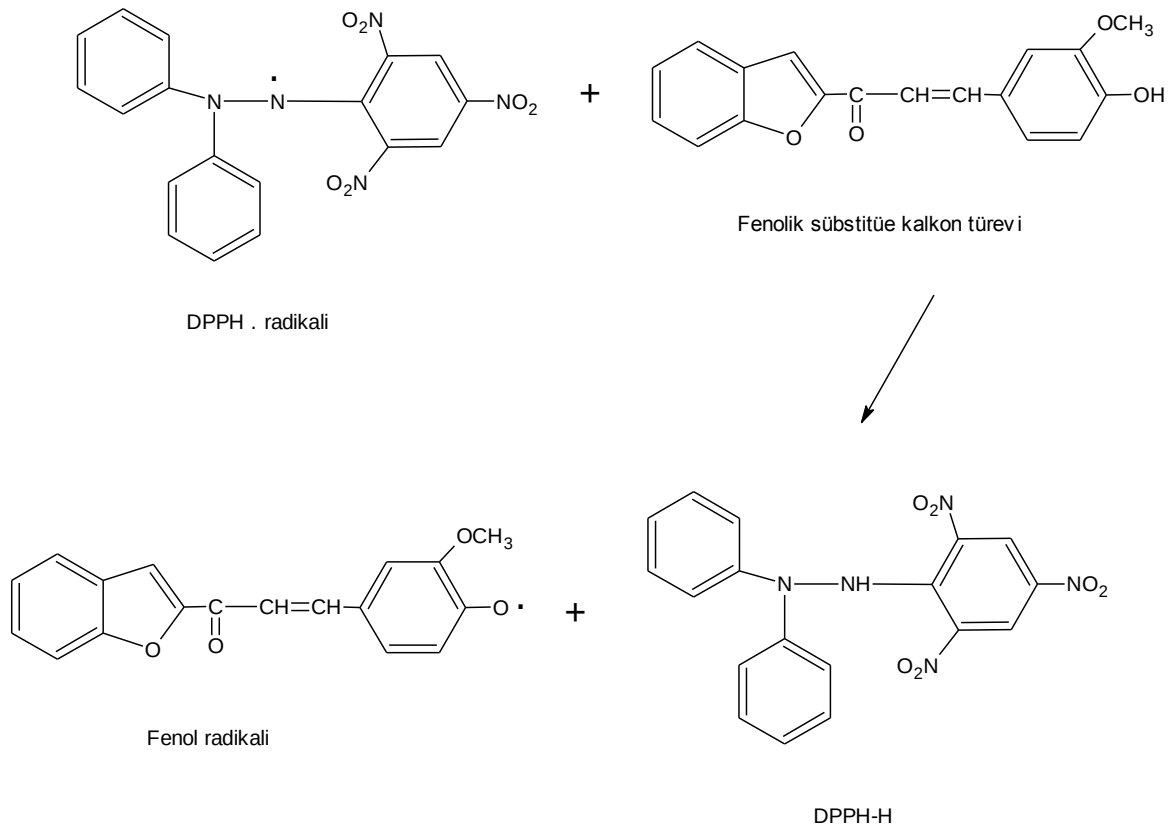
Fenol radikallerinin rezonans yapıları;



Gıdalarda koruyucu olarak kullanılan BHT, sentetik bir fenoldür. Halkadaki metil grubu yerine $-\text{OCH}_3$ grubunun bulunduğu BHA da başka bir koruyucu maddedir. Bitkisel yağlarda, özellikle de buğday tohumu yağında doğal olarak oluşan α -tokoferol ya da E vitamininin bir koruyucu madde olduğu belirlenmiştir.



Çalışmamızda çeşitli kalkon ve pirazolin türevlerinin DPPH ile etkileşimine bakıldığında D5, D6, D8, D11 kodlu maddelerinin önemli ölçüde etki gösterdiği saptanmıştır. Bu maddelerin yapıları incelendiğinde pirazolin süstitüe fenol ve fenol halkasına elektron salıcı grupların bağlandığı görülmüştür. Bilindiği gibi fenol radikalleri kararlı radikaller oldukları için iyi sonuç vermişlerdir. Üstelik fenol halkasına $-\text{OCH}_3$ gibi elektron salıcı gruplar bağlandığında ise daha iyi etki gösterdiği bulunmuştur. Başka bir ifadeyle; fenol halkasındaki $-\text{OH}$ grubu ile etkinliği fazla olan radikal (DPPH) reaksiyona girerek daha kararlı olmayan fenol radikallerini meydana getirmektedir.



Bir reaksiyonda her zaman, hangi ürün kararlıysa o ürün oluşur. Kararsız ve etkinliği fazla olan ürünlerin ortamda bulunma ihtimali düşüktür. Yukarıda geçen reaksiyonda da fenol radikali, DPPH' radikalinden daha kararlı olduğu için ortamda fenol radikalinin bulunma olasılığı çok daha yüksektir. Ayrıca elektron salıcı (-OCH₃) gruplarının varlığı da yapıya ekstra kararlılık kazandırmaktadır.

Genellikle fenol halkasının sübstütie kalkon türevlerinin (D5 hariç) DPPH* radikal ile iyi sonuçlar vermediği görülmüştür. Bunun sebebi bu yapılarda baştan başta konjugasyon olmasıyla yorumlanabilir. Şöyleki yapıdaki konjugasyon fenol halkasındaki elektron yoğunluğunun azalmasına sebep olacaktır. Elektron yoğunluğu azaldıkça fenol radikalinin kararlılığı da azalacaktır. Dolayısıyla daha etkin radikaller ortaya çıkacaktır. Bu da sonucu olumsuz etkilemektedir.

Pirazolin sübstütie fenol türevlerinin kalkon sübstütie fenol türevlerine göre daha iyi sonuç vermesinin sebebi ise, pirazolin sübstütie fenol türevlerinde konjugasyonu bütün yapıya dağılmaz. Ayrıca -NH grubu elektron salıcı bir gruptur. Dolayısıyla elektron yoğunluğu kalkon sübstütie fenol türevlerine göre daha fazladır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da pirazolin sübstütie fenol radikallerinin kalkon sübstütie fenol radikallerine göre daha kararlı olduğunu desteklemektedir.

In vitro'da organik maddelerin DPPH serbest radikal temizleme etkisinin yanında MDA düzeyi üzerine etkisi de araştırıldı. Serbest radikallerin, membranların reseptörlerine kovalent bağlanması, çoklu doymamış yağ asidi/protein oranını değiştirir ve lipid peroksidasyonunu başlatır [198]. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi MDA olan reaktif karbon bileşiklerini meydana getirirler. Bu nedenle MDA miktarı ölçümü dokulardaki lipid peroksidasyon derecesini yansıtmaktadır. MDA, molekül oksijen azalması yaparak süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olur, bu ürünlerde hücre ve dokulara hasarlayıcı etki yaparlar.

Madde gruplarının *in vitro* ortamda LPO üzerine etkileri karşılaştırıldığında; 10 µl çalışılan grupta LPO miktarının kontrole göre tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı saptandı. Konsantrasyon miktarındaki artışa paralel olarak kontrole göre, FR grubu ile; D1, D2, D3, D4, D10, ve D11 kodlu maddelerde LPO miktarın belirgin düzeyde artmasına rağmen; resveretrol ile D6, D7 ve D9 kodlu maddelerde daha az oranda arttığı belirlendi. D5 ve D8 kodlu maddelerin MDA miktarını önemli ölçüde azalttığı saptandı. Bulgularımıza göre; *in vitro* ortamda MDA değerinin Fenton reaktifi içeren gruplarda yüksek çıkmasının FeCl_2 ve H_2O_2 maddelerinin radikal etki göstererek lipid peroksidasyonunu arttırdığına delil teşkil etmesi ile açıklanabilir ve aynı etkinin MDA miktarı yüksek çıkan gruplarda da etkili olduğu düşünülebilir.

Bindoli vd [30-31], benzofuran türevi bileşiklerin lipid peroksidasyonu sonucu oluşan oksidanları (sülfhidril grup oksidanlarıyla etkileşerek) berteraf ettiğini ve dolayısıyla antioksidan olduğunu bildirmişlerdir.

4.2. Anaerobik Kültür Ortamda Madde Gruplarının Etkisi

Organik maddelerin *Saccharomyces cerevisiae*'nin biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkileri araştırılırken öncelikli olarak maddelerin bu mikroorganizmadaki lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı. Ancak yapılan deney sonunda mayada lipid peroksidasyon ürünlerinin çok düşük seviyelerde olduğu saptandı. Bunun nedeninin *Saccharomyces cerevisiae*'nin kullandığımız radikallere karşı oldukça yüksek seviyede direnç oluşturmasından kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda H_2O_2 'nin bazı hücre zarlarından serbest bir şekilde difüze olmadığını ortaya koymuştur. Başta *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve bir memeli hücresi olan Jurkat-T hücrelerinde H_2O_2 'nin difüzyonuna karşı

biyomembranlarında bir bariyer sisteminin olduğu bildirilmiştir [199-200]. Bu etkinin H_2O_2 'nin konsantrasyonuna bağlı olduğu, düşük seviyedeki H_2O_2 'e karşı maya hücresinin adaptasyon gösterdiği, yüksek seviyedeki H_2O_2 'e karşı ise direnç ortaya koyduğu belirlenmiştir. Folmer vd. [199] çalışmalarında, *Saccharomyces cerevisiae* plazma membranlarının H_2O_2 'ye maruz kaldıktan sonra birkaç dakika içerisinde hızlı bir şekilde geçirgenlik ve biyofizyolojik özelliklerini değiştirdiğini gözlemlemişler ve bu değişikliklerin lipid bileşimindeki değişimlerden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Matias vd. [201], H_2O_2 tarafından plazma membran geçirgenliğinde meydana gelen azalma ile H_2O_2 'in hücre içine girişinin daha zor gerçekleştiğini göstermişler ve bu mekanizmanın oluşmasında yağ asit sentetaz'ın (FAS) anahtar bir molekül olduğunu ilk kez tespit etmişlerdir. FAS'ın hem ekspresyonunda hem de aktivitesinde ki azalmanın mayada H_2O_2 'e karşı oluşan adaptasyon ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. FAS aktivitesindeki bu değişimlere paralel şekilde membranda çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarının artarak membranın H_2O_2 'in geçişine engel olduğu hipotezini ileri sürmüşlerdir. Mayanın gösterdiği bu direnç üzerine bir diğer hipotez ise *Shizosaccharomyces pompei* üzerinde yapılan çalışma ile ileri sürülmüştür [202]. Bu çalışma ile ergosterol sentez yolundaki bir genin (ERG3 ya da ERG6) delesyonu ile toplam sterol seviyesinin azalması sonucu membran sterol bileşiminin değişerek mayanın H_2O_2 'e karşı daha dirençli hale gelebildiği ileri sürülmüştür.

Yine *Saccharomyces cerevisiae*'nin H_2O_2 'e karşı direncinin açıklandığı bir diğer çalışmada da mayanın geçirdiği gelişme fazlarındaki direnç seviyesi araştırılmış ve çalışma sonunda mayanın durağan fazda H_2O_2 ' gibi oksidanlara karşı direncinde artış olduğu ortaya konmuştur [200]. Tüm bu araştırmalar bulgularımız ile paralellik göstermektedir. Çünkü *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına inkübasyonun 24. saatinde eklenen radikallerin hücre ölümüne yol açmadığı gibi lipid oksidasyonu oluşumunu da gerçekleştirmediğini gözlemledik. Buna neden olarak mayanın özellikle de durağan fazında oksidana karşı direnç artışı göstermediği ve hücre membranında bulunan çoklu yağ asitlerinin membran geçirgenliğini azalttığı düşünülebilir.

Madde gruplarının *Saccharomyces cerevisiae*'nin yağ asidi profili üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında palmitik asid, stearik asid ve oleik asit miktarlarının D4, D5, D8, D9, D10, ve D11 kodlu madde gruplarında arttığı; buna karşılık D3 kodlu madde de azaldığı saptandı. Docosaenoik asit (22:1) ve docosadienoic asit (22:2) miktarları kontrole göre D1 ve D6 kodlu maddelerde artarken, artışın D6 kodlu maddede daha belirgin

düzeyde olduğu saptandı. Palmitoleik asit (16:1) miktarının kontrole göre; D1, D2, D6, D8 D9 ve D11 kodlu maddelerde artarken, D4, D5 ve D10 kodlu maddelerde azaldığı saptandı. Laurikasit (12:0) miktarının kontrole göre; D1 ve D4 kodlu maddede arttığı halde; D5, D6, D8, D9, D10 kodlu maddeler de azaldığı gözlemlendi. Palmitik asit(16:0) miktarının kontrole göre; D3 ve D6 kodlu maddelerde azalmasına rağmen; D1, D2, D4, D5, D8, D9, D10, D11, kodlu maddelerde arttığı saptandı.

Kullanılan karbon kaynağının farklı olması sentezlenen bu yağ asitlerinin transkribinden sorumlu olan enzimlerin aktivitesini inhibe ya da stimüle ederek yağ asidi miktarlarında farklılığa yol açabilmektedir.

McDonough ve Roth [203], mayadan yağ asidi sentezini araştırdıkları çalışmalarında *Schizosaccharomyces pombe*'nin iki farklı gelişme ortamında (20 °C ve 30 °C) palmitik asit, palmitoleik asit, oleik asit ve linoleik asit sentezi olduğunu gözlemlemişler. Ayrıca çalışma sonucunda *Schizosaccharomyces pombe* hücrelerinde oleik asit (18:1) sentezinin stearil CoA desaturaz'ın (Δ^9 desaturaz) kontrolüyle mümkün olduğunu saptamışlardır.

Buna ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalarla hem yağ asit sentetaz, hem de Δ^9 desaturaz enzim aktivitelerinin farklı diyetler yolu ile etkilendiği ortaya konulmuştur [180-182].

Martin vd. [207], yaptıkları çalışma sonucunda; *Saccharomyces cerevisiae*'de ve diğer mayalarda tekli doymamış yağ asitlerinin Δ^9 desaturase yoluyla doymuş açıl CoA öncüllerinden oluştuğunu bildirmiştir. Çalışmada ayrıca *Saccharomyces cerevisiae*'de desaturaz geni OLE1'in farklı karbon kaynağı, metal iyonları ve oksijen seviyesi içeren farklı uyaranların bir kısmına cevap oluşturduğunu ve gen ekspresyonunun düzenlendiğini belirlemiştir. Çünkü membran yağ asidi bileşimi açık bir şekilde çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca hücrenin yağ asidi bileşimi, gelişme ortamının karbon kaynağından da etkilenebilir [208-209].

Arias vd. [210] ise; *Saccharomyces cerevisiae*'nin geleneksel yöntemlerle elma suyunda uygulanan fermantasyonunun yağ asitleri üzerine etkisini araştırmışlardır ve çalışmalarında bizimde çalışmamız sonucunda sentezini gözlemlediğimiz miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik ve linoleik asit sentezinin olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu yağ asitlerinden palmitik asidin fermantasyon teknolojisi için önemli bir değere sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Torija vd. [211], yılında *Saccharomyces cerevisiae*'nin yağ asidi bileşimi üzerine nitrojen kaynaklarının etkisini araştırdıkları çalışmalarında mayanın gelişme ortamının içeriğinin ve çevresel şartların hücre membran yağ asidi bileşimini etkilediğini tekrar vurgulamışlardır. Bu düşüncenin temelinde ise; plasma membranının mayanın içinde bulunduğu çevre ile temas kuran ilk hücre kısmı olmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Gurvitz vd. [212], yaptıkları çalışmada; *Saccharomyces cerevisiae*'den sentezlenen linoleik asit izomerlerinin insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu izomerlerin özellikle antikarsinogenezis, antiarteriosklerotik ve yağlanmayı azaltıcı etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca yapılan bu çalışmalara ek olarak yapılan bir araştırmada ise sıcaklık, oksijen ve besin sınırlanması gibi çevresel faktörlerden *Saccharomyces cerevisiae*'nin açık bir şekilde etkilenecek plazma membranında bazı adaptasyonlar oluşturduğu saptanmıştır ve plazma membranlarındaki bu değişikliklerin lipid bileşimindeki modifikasyonlarla açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir [213].

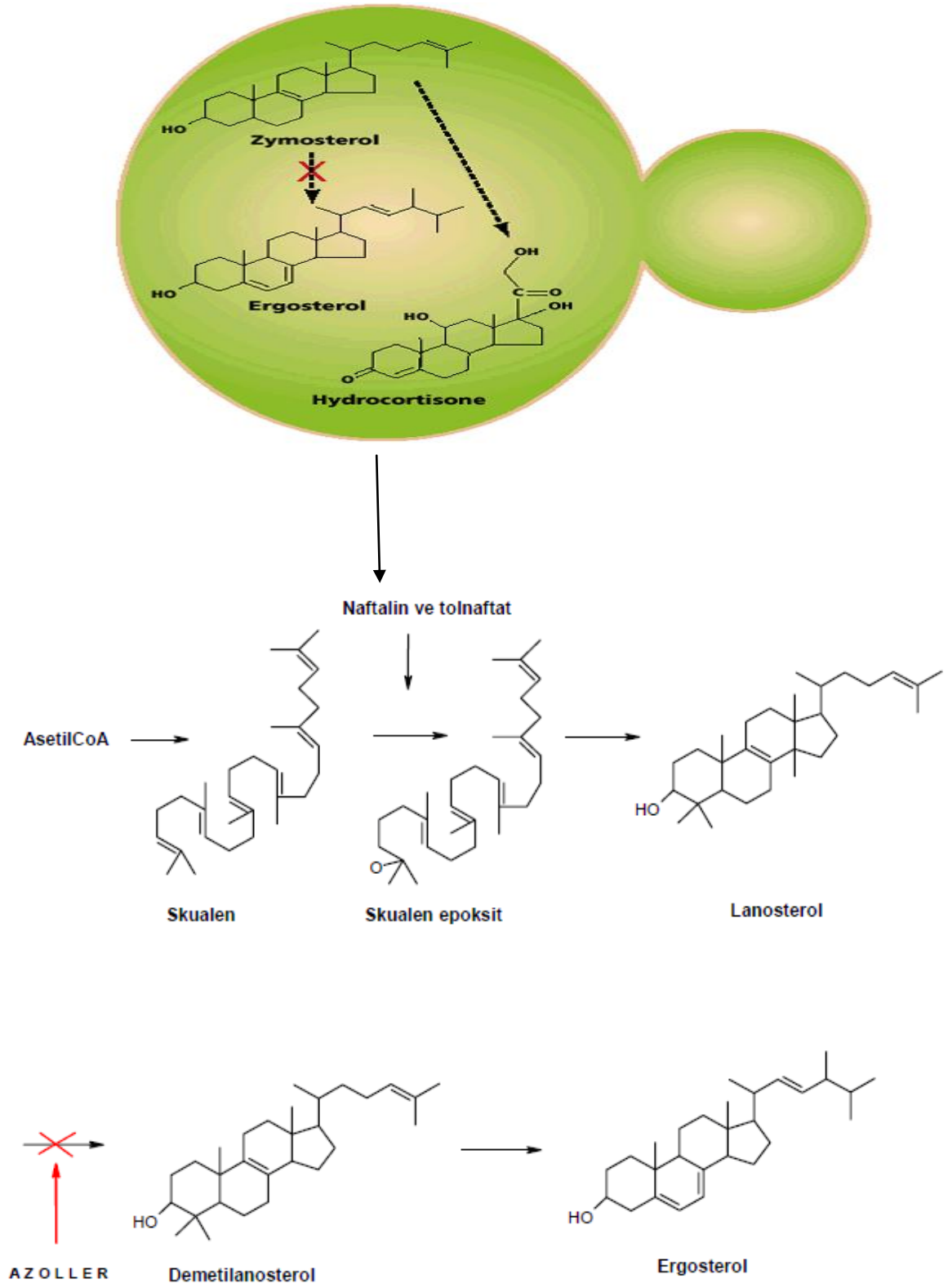
Buna ilave olarak bir hücrenin yağ asidi içeriğinin aynı zamanda gelişme ortamının lipid içeriğine de bağlı olarak değişiklik gösterebildiği yapılan çalışmalarla belirtilmiştir [209, 213].

Çalışmamızda kullanılan madde gruplarının *Saccharomyces cerevisiae*'nin lipofilik vitaminler ve fitosterol sentezini farklı oranlarda etkilediği çalışmamız sonucunda ortaya konulmuştur. Fitosterollerin; D1, D5, D10, kodlu maddelerde daha belirgin düzeyde arttığı saptandı.

Yapılan çalışmalar ile farklı karbon, nitrojen kaynaklarının ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamında bulunan diğer bileşenlerin hücre gelişimini ve ergosterol sentezini etkilediği ortaya konmuştur [214-215]. Başka bir çalışmada ise ergosterol sentezinin bu faktörlerin yanı sıra oksijen tüketim oranıyla da ilişkili olduğu rapor edilmiştir [214,216]. *Saccharomyces cerevisiae*'de ergosterol mitokondriyal ATPaz aktivitesinde önemli bir role sahiptir ve aynı zamanda salgı keseciklerinin önemli bir bileşenidir [217-218]. Ayrıca maya hücresinin temel sterolü olan ergosterolün membran yapısının geçirgenlik, akıcılık gibi özelliklerinden ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Mayanın sentezlediği ergosterol, aynı zamanda D vitamini ile kortizon üretiminde ticari olarak sıkça kullanılır [219-220]. Son yıllarda yapılan çoğu araştırma ile mayadan ergosterol sentezinin artırılması amaçlanmıştır [214,220-221]. Çalışmamızda kontrole kıyasla; D1, D2, D5, D7, D8, D9,

D10, D11 kodlu maddelerde görülen ergosterol miktarında dikkat çekici seviyedeki artışın, mayadan ergosterol sentezini arttırmak için yapılan çalışmalara yardımcı olabileceğini düşündürdü ve böylece araştırmamızın biyoteknolojik yönden önemli bir çalışma olduğu sonucuna varıldı.

D6, D3 kodlu maddelerin kontrole göre ergosterol seviyesini azalttığı gözlenmiştir. Bu azalmanın ortama eklenen maddelerden kaynaklandığı ve imidazol ve pirazol içerikli antifungal ilaçların aynı etki mekanizmasından yola çıkılarak D6 ve D3 kodlu maddelerin antifungal etki gösterebileceğine kanıt teşkil edebilir. İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçlar, mantar hücrelerinin sitoplazma membranındaki ana sterol bileşici olan ergosterol'un sentezini, 14- metillanosterol'un desmetildihidrolanosterol'a dönüşümü basamağında inhibe etmektedir. Bu dönüşümü yapan 14 α -demetilaz enzimi, bir mikrozomal sit-P450 enzim türüdür. İmidazol ve triazol türevi ilaçlar bu sit-P450'yi selektif olarak inhibe etmektedir. Mantarların sit-P450'si, imidazol türevlerine memelilerin aynı enzimlerine kıyasla en az 1000 kez daha duyarlıdır. Bu fark ve seçicilik triazol türevlerinde imidazol türevlerinde olduğundan yaklaşık 10000 kez daha fazladır. İmidazollere ve triazollere maruz kalan mantar hücrelerinde 14 α -metil steroller birikmekte ve bunlar membran fosfolipitlerinin asil zincirlerinin normal düzenini ve membrana bağlı belirli enzimlerin fonksiyonlarını bozmaktadırlar. Sonuçta mantar hücrelerinin büyümeleri inhibe olmakta; ayrıca hücre membranının permeabilitesi de bozulmaktadır. Şekil 4.1'de Azollerin, ergosterol biyosentezini inhibe etme mekanizması görölmektedir [97].



Şekil 4.1. Mayalarda azollerin, ergosterol biyosentezini inhibe etme mekanizması [97]

Ülkemizde ve dünyada antibakteriyal ve antifungal etkileri olması amaçlanan birçok yeni sentetik bileşik, laboratuvar koşullarında sentezlenmiş ve aranılan etkilere sahip olup olmadıkları test edilmiştir [222].

Ambrosio ve Goldin [133,135] yapmış oldukları araştırmalarında, oksidatif stres sonucu ROS oluşumunun hücre hasarına yol açtığını ve bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutatyonun indirgenmiş formunun (GSH) oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlandığını belirtmişlerdir. Glutatyon peroksidazın (GSH-Px) katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'nin enzim aktivitesi için esas olduğunu ortaya koymuşlardır. Oksidasyon sonucunda oluşan GSSG (Glutatyon disülfid) ise glutatyon redüktaz isimli enzim aracılığıyla geri dönen bir siklusla GSH'a rejenere olduğunu belirtmişlerdir.

Cochrane [139] ve Ambrosio [133] araştırmalarında; hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aştığını ve oksidatif strese neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Oksidatif strese cevapta GSH miktarlarında azalma ve GSSG miktarında artma olabilir. GSH ve GSSG konsantrasyonlarındaki karşılıklı değişim oksidatif stresin işaretlerinden biri olarak düşünülen GSSG/GSH oranıyla ifade edilmektedir [223].

Etkinliği araştırılan organik maddelerin ilavesinin, *Saccharomyces cerevisiae*'den sentezlenen glutatyon miktarları üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında D2, D3, D11 kodlu maddelerin, glutatyon miktarını arttırdığı; D1, D4, D5, D6, , D7, D8, , D9 D10 kodlu madde gruplarının ise azalttığı saptandı. D2, D3 D11 kodlu maddelerde artışın sebebi olarak; mayanın radikale karşı bir savunma mekanizması geliştirerek glutatyon miktarını arttırdığı ve böylece oksidatif hasarlara karşı adaptasyon sağlayabildiğini ileri sürebiliriz. Bu görüşümüz, Izawa ve ark. [224] tarafından yapılan çalışma ile de desteklenmektedir. Bu araştırmacılar, çalışmalarında H₂O₂'ye karşı oluşturulan adaptasyonlardan birinin intraselüler glutatyonun artışının olabileceğini bildirmişlerdir.

Ayrıca, Penninckx [225], *S. cerevisiae*'nin farklı besin kaynaklarına ve oksidatif strese cevap olarak glutatyon sentezlediğini saptamıştır.

D1, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10 kodlu madde gruplarında glutatyon miktarındaki azalmanın sebebi olarak, radikallerin erken safhada yok edilmesi olduğu düşünülebilir.

Saccharomyces cerevisiae'nin organik madde içeren ortamdaki toplam protein düzeyleri kıyaslandığında D4, D5, D9 kodlu maddelerin toplam protein miktarını azalttığı, buna rağmen D1, D2, D3, D6, D7, D8, D10, D11 kodlu maddelerin toplam protein miktarını arttırdığı saptandı. Bazı gruptaki GSH düzeyinin artmasına paralel olarak

antioksidan enzim konsantrasyonları da artmaktadır. Bu antioksidan enzimler katalaz, GSH px, Glutasyon redüktaz, Glutasyon S transferaz ve SOD gibi enzimlerdir. Bu enzimlerin ekspresyonu yükseldiği zaman protein miktarları da dolaylı olarak yükselir.

Lee vd. [226], *Saccharomyces cerevisiae*'de iyon radyasyonuna karşı süperoksit radikalinin koruyucu etkisinin araştırdıkları çalışmalarında mayada radyasyon sonunda SOD'un yanı sıra katalaz ve glutasyon redüktaz enzimlerinin düzeylerinin yüksek seviyede arttığını gözlemlemişlerdir. CuZn SOD ile Mn SOD'un mayayı radyasyona karşı korumada önemli bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu etkinin oluşumunu ise iyon radyasyonu altında reaktif oksijen türlerinin açığa çıkmasıyla kontrol sistemindeki bir genden maya hücrelerinde ROS konsantrasyonunu baskılamak amacıyla SOD salınımının başlaması ve koruyucu etki göstermesi ile açıklamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarla da hücre hasarı ile SOD aktivitesindeki artışı ya da azalışı arasında bir korelasyon olduğu düşüncesi bildirilmiştir [226-227].

Saccharomyces cerevisiae'nin gelişme ortamında fermentable karbon kaynağı olarak glukoz yaygın bir şekilde kullanılan bir model sistemdir. Bu şartlar altında glukoz tarafından antioksidan enzimlerin çoğu etkilenir ve aerobik olarak gelişen hücrelerde SOD, katalaz ve peroksidazlar başta olmak üzere bu enzimlerinin miktarının artmasında rol oynar [228-229]. Diğer bir deyişle maya gelişimi için sıkça kullanılan bu sistem doğal şartlarda nadir olarak gerçekleşir. Mayalarla beraber birçok mikroorganizma gelişme ortamlarında besin kıtlığı dönemlerinde yaşayabilmek için glukozu yavaş yavaş tüketirler.

Maya durağan fazda enerji elde etmek ve hayatta kalmak için mitokondriyal solunum yapmak zorunda kalır. Böylece mayada antioksidan ve TCA döngüsü enzimlerinin rolü artar [228-230].

Lushchak ve Gospodaryov [229] çalışmalarında *Saccharomyces cerevisiae*'nin etanol içeren ortamdan glukoz içeren ortamın daha fazla katalaz aktivitesini arttırdığını saptamışlardır.

Böylece bizim de çalışmamızda belirttiğimiz gibi farklı kültür şartlarının bu enzim seviyesini etkilediği sonucuna varmışlardır. Izawa vd. [224], *Saccharomyces cerevisiae*'de normal şartlar altında katalazın önemli bir rolü olmadığını ancak oksidatif stres altında mayanın yaşamını devam ettirmek için katalaz miktarını artırdığını tespit etmişlerdir.

Diğer bir antioksidan enzim olan glutasyon redüktazın varlığı da *Saccharomyces cerevisiae* mayası üzerindeki çalışmalarla ortaya konmuştur. Cardosa vd. [231], NADPH varlığında *Saccharomyces cerevisiae*'de glutasyon redüktazın (G) inaktivasyonu üzerinde

demir iyonlarının etkisini araştırmışlar ve G inaktivasyonu ile ortama ilave edilen demirin Fe(II) miktarının ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna karşılık G reaktivasyonunda Fe(III)'ün etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar G'nin NADPH ve Fe(II) tarafından indirgeyici bir enzim yardımıyla etkisiz hale getirildiğini göstermiştir. Buna ek olarak Hermes-Lima vd. [232], tarafından yapılan bir araştırma ile serbest radikal temizleyicileri, DMSO ve etanolün glutatyon redüktazı etkisiz hale gelmekten koruyamadığını saptamışlardır. Bir diğer çalışmada ise bunun tersi yönde maya glutatyon redüktazının H₂O₂ varlığında bakır iyonları tarafından etkisiz hale getirilmesinde hidroksil radikali temizleyicilerini ve metal şelatörlerinin önleyici etkisi olduğu bildirilmiştir [233].

Deneylerden elde edilen sonuçlara göre, hem *in vitro* hem de *Saccharomyces cerevisiae* bulunan anaerobik kültür ortamında, yeni sentezlenmiş organik maddelerin biyolojik etkinliği araştırılmış ve elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- *In vitro* 'da DPPH serbest radikal temizleme etkisi incelenmiş; D5, D6 ve D8 kodlu maddelerin etkin antioksidan özellik gösterdiği; D3 ve D11 kodlu maddelerin ise D5, D6 ve D8 kodlu maddelere oranla antioksidan etkilerinin daha sınırlı olduğu saptanmıştır.
- Madde gruplarının *in vitro* ortamda LPO üzerine etkileri karşılaştırıldığında; D5 ve D8 kodlu maddelerin MDA miktarını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu azalma D5 ve D8 kodlu maddelerin antioksidan özellik göstererek lipit peroksidasyonu azaltmış olması ile açıklanabilir. Ve bu çalışma; DPPH serbest radikal temizleme etkisi üzerine yapılan çalışmanın sonucuna paralel olarak D5 ve D8 kodlu maddelerin kuvvetli antioksidan özellik gösterdiğini desteklemektedir.
- Organik maddelerin *Saccharomyces cerevisiae*'nin biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkileri araştırılırken öncelikli olarak maddelerin bu mikroorganizmada ki lipit peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı. Ancak yapılan deney sonunda mayada lipit peroksidasyon ürünlerinin çok düşük seviyelerde olduğu saptandı. Bunun nedeninin *Saccharomyces cerevisiae*'nin kullandığımız radikallere karşı oldukça yüksek seviyede direnç oluşturduğu sonucuna varıldı.
- Çalışmamızda, D1, D2, D5, D7, D8, D9, D10, D11 kodlu maddelerin kontrole kıyasla ergosterol seviyesinde artışa neden olduğu, böylece mayadan ergosterol sentezini arttırmak için yapılan çalışmalara yardımcı olabileceği ve biyoteknolojik alanda da önemli bir çalışma olduğu kanısına varıldı.

- Ayrıca D3 ve D6 kodlu maddelerin kontrole göre ergosterol seviyesini azalttığı gözlenmiştir. Bu azalmanın ortama eklenen maddelerden kaynaklandığı ve imidazol ve pirazol içerkli antifungal ilaçların aynı etki mekanizmasından yola çıkılarak D3 ve D6 kodlu maddelerin antifungal etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

5. KAYNAKLAR

- [1] **Whitehead, T.P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J. and Hale, A.,** 1995. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical Chemistry*, **41**(1), 32-35.
- [2] **Stavric, B.,** 1994. Role of chemopreventers in human diet. *Clinical Biochemistry*, **27**(5), 319-332.
- [3] **Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M.,** 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, **186**, 343-355.
- [4] **Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A.T., Corrêa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E.C., Assreuy, J., Calixto, J.B. and Santos, A.R.,** 2003. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**(4), 1449-1451.
- [5] **Rao, Y.K., Fang, S.-H. and Tzeng, Y.-M.,** 2004. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**(10), 2679-2686.
- [6] **Buolamwini, J.K., Addo, J., Kamath, S., Patil, S., Mason, M. and Ores, M.,** 2005. Small molecule antagonists of the Mdm2 oncoprotein as anticancer agents. *Current Cancer Drug Targets*, **5**(1), 57-68.
- [7] **Herencia, F., Ferrándiz, M.L., Ubeda, A., Domínguez, J., Charris, J.E., Lobo, G.M. and Alcaraz, M.J.,** 1998. Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**(10), 1169-1174.
- [8] **Fayed, T.A. and Awad, M.K.,** 2004. Dual emission of chalcone-analogue dyes emitting in the red region. *Chemical Physics*, **303**(3), 317-326.
- [9] **Jovanovic B. Z., Misić-Vucovic M., Marinkovic A. D., Csanadi J.,** 1999. ¹³C NMR spectra of pyridine chalcone analogs. *Journal of Molecular Structure*, **482**(2), 371-374.
- [10] **Lin, Y.-M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.-M., Nie, W. and Chen, F.-C.,** 2002. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**(8), 2795-2802.
- [11] **Nakamura, C., Kawasaki, N., Miyataka, H., Jayachandran, E., Kim, I.H., Kirk, K.L., Taguchi, T., Takeuchi, Y., Hori, H. and Satoh, T.,** 2002. Synthesis and biological activities of fluorinated chalcone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**(3), 699-706.
- [12] **Nam, N.-H., Kim, Y., You, Y.-J., Hong, D.-H., Kim, H.-M. and Ahn, B.-Z.,** 2003. Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38**(2), 179-187.

- [13] **Gilchrist, T.L.**, 1985. Heterocyclic chemistry. *Longman Group Uk Limited*, p.174, England.
- [14] **Bogdal, D. and Warzala, M.**, 2000. Microwave-assisted preparation of benzofurans under solventless phase-transfer catalytic conditions. *Tetrahedron*, **56**(44), 8769-8773.
- [15] **Coşkun, D. and Ahmedzade, M.**, 2008. 3-(Substituted aryl)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propenones, Part 1: synthesis and characterization of some novel chalcones. *Synthetic Communications®*, **38**(21), 3613-3622.
- [16] **Békássy, S., Ágai, B., Farkas, J., Gábor, E., Ferenczi, M. and Figueras, F.**, 2007. An environmentally friendly route for the synthesis of benzofurane derivatives using selective ring acylation of resorcinol. *Catalysis Letters*, **118**(3-4), 219-223.
- [17] **Wahab Khan, M., Jahangir Alam, M., Rashid, M. and Chowdhury, R.**, 2005. A new structural alternative in benzofurans for antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**(16), 4796-4805.
- [18] **Kirilmis, C., Ahmedzade, M., Servi, S., Koca, M., Kizirgil, A. and Kazaz, C.**, 2008. Synthesis and antimicrobial activity of some novel derivatives of benzofuran: Part 2. The synthesis and antimicrobial activity of some novel 1-(1-benzofuran-2-yl)-2-mesitylethanone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**(2), 300-308.
- [19] **Hutchinson, S.A., Luetjens, H. and Scammells, P.J.**, 1997. A new synthesis of the benzofuran adenosine antagonist XH-14. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **7**(24), 3081-3084.
- [20] **Kao, C.-L. and Chern, J.-W.**, 2002. A novel strategy for the synthesis of Benzofuran skeleton neolignans: application to ailanthoidol, XH-14, and obovaten. *The Journal of Organic Chemistry*, **67**(19), 6772-6787.
- [21] **Kinnamon, K.E., Poon, B.T., Hanson, W.L. and Waits, V.B.**, 1998. Trypanosoma cruzi: A Novel Chemical Class (Nitrobenzofurans) Active against Infections of Mice (Mus musculus). *Experimental Parasitology*, **89**(2), 251-256.
- [22] **Rádl, S., Hezký, P., Konvička, P. and Krejčí, I.**, 2000. Synthesis and Analgesic Activity of Some Substituted 1-Benzofurans and 1-Benzothiophenes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **65**(7), 1093-1108.
- [23] **Papadaki-Valiraki, A., Todoulou, O., Filippatos, E., Tsotinis, A., Ikeda, S. and De Clercq, E.**, 1993. Synthesis and antiviral activity of some new benzofuran derivatives. *Arzneimittel-Forschung*, **43**(12), 1363.
- [24] **Masubuchi, M., Ebiike, H., Kawasaki, K.-i., Sogabe, S., Morikami, K., Shiratori, Y., Tsujii, S., Fujii, T., Sakata, K. and Hayase, M.**, 2003. Synthesis and biological activities of benzofuran antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **11**(20), 4463-4478.

- [25] **Baraldi, P.G., Romagnoli, R., Giovanna Pavani, M., del Carmen Nunez, M., Bingham, J.P. and Hartley, J.A.,** 2002. Benzoyl and cinnamoyl nitrogen mustard derivatives of benzoheterocyclic analogues of the tallimustine: synthesis and antitumour activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **10**(5), 1611-1618.
- [26] **Ràdi, S., Konvicka, P. and Vachal, P.,** 2000. Treatment of 2-hydroxy-, 2-mercapto-, and 2-ethoxycarbonylamino-benzonitriles 12 with 2-fluoro-or. *Research Institute of Pharmacy and Biochemistry*, **130**, 60.
- ko, W.A., Mullican, M.D., Sorenson, R.J., Unangst, P.C., Weikert, R.J., Adolphson, R.L., Kennedy, J.A. and Thueson, D.O.,** 1992. Novel benzothiophene-, benzofuran-, and naphthalenecarboxamidotetrazoles as potential antiallergy agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **35**(5), 958-965.
- [28] **Davis, L., Agnew, M.N., Effland, R.C., Klein, J.T., Kitzen, J.M. and Schwenkler, M.A.,** 2, 3-Dihydro-3-(1-pyrrolyl) spiro [benzofuran-2, 4'-piperidine] s and 2, 3-dihydro-3-(1-pyrrolyl) spiro [benzofuran-2, 3'-pyrrolidine] s: novel antihypertensive agents. *Journal of medicinal chemistry*, 1983. **26**(10), 1505-1510.
- [29] **Ohno, M., Miyamoto, M., Hoshi, K., Takeda, T., Yamada, N. and Ohtake, A.,** 2005. Development of dual-acting benzofurans for thromboxane A2 receptor antagonist and prostacyclin receptor agonist: synthesis, structure-activity relationship, and evaluation of benzofuran derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, **48**(16), 5279-5294.
- [30] **Grisar, J.M., Bolkenius, F.N., Petty, M.A. and Verne, J.,** 1995. 2, 3-Dihydro-1-benzofuran-5-ols as Analogs of. α -Tocopherol That Inhibit in Vitro and ex Vivo Lipid Autoxidation and Protect Mice against Central Nervous System Trauma. *Journal of Medicinal Chemistry*, **38**(3), 453-458.
- [31] **Bindoli, A., Rigobello, M., Musacchio, E., Scuri, R., Rizzoli, V. and Galzigna, L.,** 1991. Protective action of a new benzofuran derivative on lipid peroxidation and sulphydryl groups oxidation. *Pharmacological Research*, **24**(4), 369-375.
- [32] **Cowley, D.J., Lukovic, L. and Petty, M.A.,** 1996. MDL 74,180 reduces cerebral infarction and free radical concentrations in rats subjected to ischaemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology*, **298**(3), 227-233.
- [33] **Gupta, R.R., Kumar, M. and Gupta, V.,** 1998. Heterocyclic Chemistry. *Springer Berlin*.
- [34] **Manna F., Chimenti F., Bolasco A., Cenicola ML., D'Amico M., Parrillo C., Rossi F., Marmo E.,** 1992. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic N-acetyl- Δ^2 -pyrazolines and dihydrothienocoumarines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **27**(6), 633-639.
- [35] **Bilgin A.A., Palaska E., Sunal R.,** 1993. Studies on the synthesis and antidepressant activity of some 1-thiocarbamoyl-3,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Arzneimittel-Forschung/drug*, **43**(10), 1041-1044.

- [36] **Cheeseman, K. and Slater, T.**, 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49**(3), 481-493.
- [37] **Basaga, H.**, Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology*, 1990. **68**(7-8): p. 989-998.
- [38] **Sies, H.**, 1993. 1994, Strategies of antioxidant defense, *EJB Reviews Springer*, 101-107.
- [39] **Hinder, R.A. and Stein, H.J.**, 1991. Oxygen-derived free radicals. *Archives of Surgery*, **126**(1), 104.
- [40] **Diplock, A.**, 1990. The role of antioxidants in clinical practice. *British Journal of Clinical Practice*, **44**(7), 257-258.
- [41] **Mayer, B., Pfeiffer, S., Schrammel, A., Koesling, D., Schmidt, K. and Brunner, F.**, 1998. A New Pathway of Nitric Oxide/Cyclic GMP Signaling Involving S-Nitrosoglutathione. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(6), 3264-3270.
- [42] **Kurt, H., Başaran, A. and Musmul, A.**, 2004. Sıçanlarda Karbon Tetraklorit (CCl₄)'in Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ile Önlenmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **33**, 29-34.
- [43] **Little, R.E. and Gladen, B.C.**, 1999. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, **13**(5), 347-352.
- [44] **Akkuş, İ.**, 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimosa Yayınları, Konya*.
- [45] **Sengil, A., Gürbilek, M., Altındış, M., Uysal, H., Koşar, A. and Baysal, B.**, 1995. The effect of anti-HCV seropositivity on the TNF-alpha level in hemodialysis patients. *Clinical Nephrology*, **44**(1), 69-70.
- [46] **Czapski, G.**, 1984. Reaction of OH. *Methods in Enzymology*, **105**, 209-215.
- [47] **Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., Yoshida, N. and Imaizumi, T.**, 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *American Heart Journal*, **135**(1), 115-120.
- [48] **Carr, A.C., McCall, M.R. and Frei, B.**, 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, **20**(7), 1716-1723.
- [49] **Slater, T.F.**, 1989. Free radical mechanisms in tissue injury, in cell function and disease. *Springer*, 209-218.
- [50] **Davies, M.J.**, 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**(3), 761-770.

- [51] **Alderton, W., Cooper, C. and Knowles, R.,** 2001. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, **357**, 593-615.
- [52] **Liew, F., Li, Y. and Millott, S.,** 1990. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*, **71**(4), 556.
- [53] **Butler, A.R., Flitney, F.W. and Williams, D.L.H.,** 1995. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: A chemist's perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, **16**(1), 18-22.
- [54] **Murphy, M.P.,** 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1411**(2), 401-414.
- [55] **Lunec, J.,** 1990. Free radicals: Their involvement in disease processes. *Annals of Clinical Biochemistry*, **27**, 173-182.
- [56] **Sienko, M. J. and Plane, R. A.,** 1966. Chemistry: principles and properties pp.491, McGraw-Hill. New York.
- [57] **Royston, D.,** 1988. Free radicals. *Anaesthesia*, **43**(4), 315-320.
- [58] **Sies, H.,** 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, **69**(21-23), 965-968.
- [59] **Kenneth, B.B., Bruce, N.A.,** 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol Reviews*, **78** (2) ,547-581.
- [60] **Kankofer, M.,** 2002. Placental release/retention in cows and its relation to peroxidative damage of macromolecules. *Reproduction in Domestic Animals*, **37**(1), 27-30.
- [61] **Uysal, M., Bulur, H., Sener, D. and Oz, H.,** 1986. Lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, **24**(9), 474-476.
- [62] **Yu, B.P.,** 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, **74**(1), 139.
- [63] **Gutteridge, J.,** 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **41**(12), 1819-1828.
- [64] **Agrawal, A. and Kale, R.,** 2001. Radiation induced peroxidative damage: mechanism and significance. *Indian Journal of Experimental Biology*, **39**(4), 291.
- [65] **Altuntaş, Y., Güven, M., İnce, E., Açbay, Ö., Caner, M. and Kanigür-Sultuybek, G.,** 1995. The in vitro effects of captopril on the levels of lipid peroxidation and glutathione of erythrocytes in type II diabetes. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, **6**(3-4), 281-288.

- [66] **Dingiloğlu N., Özmen, D., Bayındır, O., Kutay, F., Yılmaz, C.,** 1993. “Diabetiklerde Eritrosit ve Plazma Lipit Peroksidleri, Eritrosit GSH ve Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Düzeyleri”, *Biyokimya Dergisi*, **18**(3), 13-18.
- [67] **Güven, A. and Gülmez, M.,** 2003. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **50**(8), 412-416.
- [68] **Aydemir, T., Öztürk, R., Bozkaya, L. and Tarhan, L.,** 2000. Effects of antioxidant vitamins A, C, E and trace elements Cu, Se on CuZn SOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes. *Cell Biochemistry and Function*, **18**(2), 109-115.
- [69] **Bhagavan, N.V.,** 1992. Medical Biochemistry. Jones and Bartlett publishers, pp. 323-351, London.
- [70] **Lehninger, A., Nelson, D. and Cox, M.,** 1993. Principles of Biochemistry, Worth, New York.
- [71] **Valenzuela, A.,** 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assesment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*, **48**, 301-309.
- [72] **Hagihara, M., Nishigaki, I., Maseki, M. and Yagi, K.,** 1984. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in the lipoprotein fractions of human serum. *Journal of Gerontology*, **39**(3), 269-272.
- [73] **Viladimir, Yu. A., Olenov, V.I., Suslova, T.B.** 1989. Lipid peroxidation in mitokondrial membrane. *Adv In lip res.* **3**(1), 28-34.
- [74] **Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. and Waeg, G.,** 1991. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **53**(1), 314S-321.
- [75] **Köse, K. and Doğan, P.,** 1995. Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes. 1. Protective effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *The Journal of International Medical Research*, **23**(1), 1.
- [76] **Köse, K. and Dogan, P.,** 1992. Lipit Peroksidasyonu, *Erciyes Üniv. Tıp Fak. Derg.*, **1**, 340-350.
- [77] **Murray, R. K., Gronner, D. K., Mayes, R. A., Rodwell, V. W.,** 1996. Fiyolojik Öneme Sahip Lipitler, Harper’ın Biyokimyası, Barış Kitapevi, İstanbul.
- [78] **Güven A.,** 2003. Kaz Karaciğerlerinde karbon tetraklorür (CCl₄) ve etil Alkol (C₂H₅OH) ile oluşturulan doku hasarlarında redükte glutatyon (GSH), glutatyon – S- transferoz (GST) ve selenyum (Se) düzeylerinin araştırılması, *Doktora Tezi*, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.

- [79] **Freeman, B.A. and Crapo, J.D.**, 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, **47**(5), 412-426.
- [80] **Halliwell, B. and Chirico, S.**, 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**(5), 715-724.
- [81] **Çiğremiş, Y.**, 1997. Sigara tiryakilerinde eritrosit içi süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, peroksidaz aktivitelerinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- [82] **Ermış, B., Yıldırım.A., Ors. R., Tastekin, A., Özkan B., Akçay F.**, 2005. Influence of smoking on serum and milk MDA, SOD, GSH-PX and antioxidant potential levels in mothers at the pasportum seventh day. *Andrologia* **37** (4):119-124.
- [83] **Tekkes, Y.**, 2006. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, S.İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- [84] **Yerer, M. and Aydoğan, S.**, 2000. Oxidants and antioxidants. *Erciyes University J. Health Sciences*, **9**(1), 49-53.
- [85] **Thomas, M. J.**, 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Critical Rew Food Sci And Nutrit.*, **35** (1-2), 21-39.
- [86] **Evelson, P., Ordóñez, C.P., Llesuy, S. and Boveris, A.**, 1997. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **38**(2), 215-219.
- [87] **Yamauchi, R. and Matsushita, S.**, 1977. Quenching effect of tocopherols on the methyl linoleate photooxidation and their oxidation products. *Agricultural and Biological Chemistry*, **41**.
- [88] **Sinclair, A., Barnett, A. and Lunec, J.**, 1990. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*, **43**(5), 334-344.
- [89] **Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O.I.**, 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **35**(1-2), 7-20.
- [90] **Hollan, S.**, 1995. Free radicals in health and disease. *Haematologia*, **26**(4), 177.
- [91] **Karlsson, J. and Semb, B.**, 1997. Vitamins Q and E, extracorporal circulation and hemolysis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **173**(1-2), 33-41.

- [92] **Öztürk-Ürek, R., Bozkaya, L.A. and Tarhan, L.,** 2001. The effects of some antioxidant vitamin-and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues. *Cell Biochemistry and Function*, **19**(2), 125-132.
- [93] **Rencüzoğulları, N.,** 2006. Ratlarda deneysel olarak oluşturulan kadmiyum toksikasyonu üzerine likopenin etkilerinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Mustafa Kemal Üniv. Sağlık Bil. Enstitüsü, Hatay.
- [94] **Chan, A.C.,** 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **71**(9), 725-731.
- [95] **Bieri, J.G., Corash, L. and Hubbard, V.S.,** 1983. Medical uses of vitamin E. *The New England Journal of Medicine*, **308**(18), 1063.
- [96] **Evans, H. M. And Bishop, K. S.** 1923. The production of sterility with nutritional regimes adequate for growth and its cure with other foodstuffs. *J. metab. Res.*, **3**, 234-316.
- [97] **Kayaalp, O.,** 2002. Farmakolojiye Giriş, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara.
- [98] **Sencer, E.,** 1991. Beslenme ve diyet. Güven Matbaası, İstanbul.
- [99] **Pfafferott, C., Meiselman, H. and Hochstein, P.,** 1982. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood*, **59**(1), 12-15.
- [100] **Niki, E.,** 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44**(2), 227-253.
- [101] **Halliwell, B. and Gutteridge, J.,** 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **280**(1), 1-8.
- [102] **Krinsky, N.I.,** 1988. Membrane antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **551**(1), 17-32.
- [103] **Reiter, R.J.,** 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, **12**(2), 151-180.
- [104] **Block, G.,** 1991. Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **54**(6), 1310-1314.
- [105] **Henson, D.E., Block, G. and Levine, M.,** 1991. Ascorbic acid: biologic functions and relation to cancer. *Journal of The National Cancer Institute*, **83**(8), 547-550.
- [106] **Maxwell, S.R.,** 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, **49**(3), 345-361.
- [107] **Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E. and Sato, K.,** 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **53**(1), 201-205.

- [108] **Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mccord, J.M. and Harman, D.,** 1987. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, **107**(4), 526-545.
- [109] **Formica, J. and Regelson, W.,** 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, **33**(12), 1061-1080.
- [110] **Lindahl, M. and Tagesson, C.,** 1993. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation*, **17**(5), 573-582.
- [111] **Ferrandiz, M. and Alcaraz, M.,** 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Actions*, **32**(3-4), 283-288.
- [112] **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G.,** 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**(7), 933-956.
- [113] **Shahidi, F., Janitha, P. and Wanasundara, P.,** 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **32**(1), 67-103.
- [114] **Clarkson, M.P.,** 1995. Antioxidants and physical performance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**,131-41.
- [115] **Aslan, R., Şekeroğlu, M.R., Gültekin, F. and Bayıroğlu, F.,** 1997. Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals: Relation to age, sex, habits, lifestyle and environment. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, **32**(8), 2101-2109.
- [116] **Aslan S., Şekeroğlu M. R., Aslan R., Bayıroğlu F.** 1996. Pentoklorofenolün tavşanlarda bazı antioksidan enzimler ile laktik asit dehidrogenaz ve kreatin kinaz düzeylerine etkisi. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* **7** (1-2),99-101.
- [117] **Şekeroğlu M. R., Aslan R., Tarakçıoğlu M., Algün E., Kara M.,** 1997. Sigara kullananlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktivite. *Tüber. Toraks. Der.*, **45** (2), 105-108.
- [118] **Chow, C.K.,** 1982. Dietary vitamin E and cellular susceptibility to cigarette smoking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **393**(1), 426-435.
- [119] **Deby, C. and Pincemail, J.,** 1988, Oxygen toxicity, free radicals, and defense mechanisms, in Rökan. *Springer*, 57-70.
- [120] **Reilly, P.M., Schiller, I.I.J., Bulkley, G.B.,** 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.*, **161**, 488-503.
- [121] **Augustin, W., Wiswedel, I., Noack, H., Reinheckel, T. and Reichelt, O.,** 1997. Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria, in detection of mitochondrial diseases. *Springer*, 199-205.

- [122] **Bast, A., Haenen, G.R. and Doelman, C.J.,** 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*, **91**(3), 2-13.
- [123] **Thiele, J.J., Traber, M.G., Tsang, K., Cross, C.E. and Packer, L.,** 1997. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. *Free Radical Biology and Medicine*, **23**(3), 385-391.
- [124] **Mecocci, P., Beal, M.F., Cecchetti, R., Polidori, M.C., Cherubini, A., Chionne, F., Avellini, L., Romano, G. and Senin, U.,** 1997. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Molecular and Chemical Neuropathology*, **31**(1), 53-64.
- [125] **Niki, E.,** 1991. Vitamin C as an antioxidant. *World Review of Nutrition and Dietetics*, **64**, 1.
- [126] **Dündar, Y. and Aslan, R.,** 2013. Antioxidative stress. *Eastern Journal of Medicine*, **5**(2), 45-54.
- [127] **Herbert, V.,** 1993. Viewpoint Does Mega-C Do More Good Than Harm, or More Harm Than Good? *Nutrition Today*, **28**(1), 28-32.
- [128] **Gutteridge, J.M., Paterson, S.K., Segal, A.W. and Halliwell, B.,** 1981. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochemical Journal*, **199**(1), 259.
- [129] **Meister, A. and Anderson, M.E.,** 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, **52**(1), 711-760.
- [130] **Meister, A.,** 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, **220**, 472-477.
- [131] **Bayşu, N. and Çamaş, H.,** 1979. Biyokimya Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- [132] **Deneke, S.M. and Fanburg, B.L.,** 1989. Regulation of cellular glutathione. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **257**(4), 163-173.
- [133] **Ambrosio, G., Santoro, G., Tritto, I., Elia, P.P., Duilio, C., Basso, A., Scognamiglio, A. and Chiariello, M.,** 1992. Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **262**(1), 23-30.
- [134] **Das, D. and Banerjee, R.K.,** 1993. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **125**(2), 115-125.
- [135] **Goldin, E., Ardite, E., Elizalde, J.I., Odriozola, A., Panes, J., Pique, J.M. and Fernandez-Checa, J.C.,** 1997. Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*, **112**(3), 855-863.

- [136] **Rene Menguy, M.**, 1981. Role of gastric mucosal energy metabolism in the etiology of stress ulceration. *World Journal of Surgery*, **5**(2), 175-179.
- [137] **Mozsik, G., Király, Á., Sütő, G. and Vincze, Á.**, 1992. ATP breakdown and resynthesis in the development of gastrointestinal mucosal damage and its prevention in animals and human (an overview of 25 years ulcer research studies). *Acta Physiologica Hungarica*, **80**(1-4), 39.
- [138] **Mutoh, H., Hiraishi, H., Ota, S., Ivey, K.J., Terano, A. and Sugimoto, T.**, 1990. Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **258**(4), 603-609.
- [139] **Cochrane, C.G.**, 1991. Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine*, **91**(3), 23-30.
- [140] **Scherer, N.M. and Deamer, D.W.**, 1986. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca^{+2} -ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **246**(2), 589-601.
- [141] **Ishikawa, T., Zimmer, M. and Sies, H.**, 1986. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS letters*, **200**(1), 128-132.
- [142] **Menguy, R., Desbaillets, L. and Masters, Y.**, 1974. Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology*, **66**(1), 46-55.
- [143] **De Ferreyra, E., Bernacchi, A. and Castro, J.**, 1986. Increased glutathione (GSH) content in livers of control and carbon tetrachloride poisoned rats treated with the anticalmodulin drug trifluoperazine (TFP). *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **53**(3), 399.
- [144] **Lamplugh, S., Hendrickse, R., Apeagyei, F. and Mwanmut, D.**, 1988. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, **296**(6627), 968.
- [145] **Murray, R.K., Mayes, P., Granner, D. and Rodwell, V.**, 1993. Harper'in Biyokimyası. Barış Kitapevi, İstanbul.
- [146] **Ross, B.M.**, 2007. ω -3 Fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipid metabolism. *Medical hypotheses*, **68**(3), 515-524.
- [147] **Bahşi, M.**, 2008. 7,12-Dmba uygulanan yaşlı sıçanların doku ve serumlarında resveratrol ve a lipoik asitin bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, ELAZIĞ.
- [148] **Champe, P.C., Harvey, R.A. and Ferrier, D.R.**, 2005. Biochemistry. *Lippincott Williams & Wilkins*.

- [149] **Aydın, A. S.**, 2004. Omega-3 yağ asitleri. Sağlıkta ve hastalıkta beslenme. İ.Ü., İstanbul, *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum dizisi*, **41**, 181-9.
- [150] <http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/membrane.htm> Fatty acid .22.02.14.
- [151] **Gözükara, E.**, 2001. Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 1, 248-258.
- [152] **Harold, H., Leslie, Craine., David , Hart.**, 2007. Organic chemistry, a short course, *Houghton Mifflin Company*, 33-40.
- [153] **Galaris, D. and Evangelou, A.**, 2002. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **42**(1), 93-103.
- [154] **Onishi, C., Jos'e, Z., Costa, V.M., Oliveira, M.A., Fortes, Z.B.** 2004. Ascorbic acid supplementation restores defective leukocyte-endothelial interaction in alloxandibetic rats, *Diabetes Metabolism Result*, **19**, 60–68.
- [155] **Nas, S., Gökalp, H., Ünsal, M.**, 2001. Bitki Yağ Teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Matbaası, 322-332. Pamukkale.
- [156] **Williams, C.M.**, 2000. Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, **49**(3), 1960-2000.
- [157] **Kayahan , M.**, 2003. Yağ Kimyası, O.D.T.Ü. Yayıncılık, 78-82, Ankara.
- [158] **Sontrop, J. and Campbell, M.K.**, 2006. ω -3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence and a methodological critique. *Preventive Medicine*, **42**(1), 4-13.
- [159] **Kaya, Y., Duyar, H.A. and Erdem, M.E.**, 2004. Balık yağ asitlerinin insan sağlığı için önemi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, **21**(3-4), 365-370.
- [160] **Liu, J. and Nes, W.D.**, 2009. Steroidal triterpenes: design of substrate-based inhibitors of ergosterol and sitosterol synthesis. *Molecules*, **14**(11), 4690-4706.
- [161] **Jialin, L., William N.**, 2009. Design of Substrate-Based Inhibitors of Ergosterol and Sitosterol Synthesis, Department of Chemistry and Biochemistry, *Texas University*, Lubbock, Texas, 79409, USA.
- [162] **Buskov, S., Möller, P., Sørensen, H., Sørensen, J.C. and Sørensen, S.**, 1998. Determination of vitamins in food based on supercritical fluid extraction prior to micellar electrokinetic capillary chromatographic analyses of individual vitamins. *Journal of Chromatography A*, **802**(1), 233-241.
- [163] **Bates, C.**, 1997. Vitamin analysis. *Annals of clinical biochemistry*, **34**, 599.
- [164] **Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwel, V.W.**, 1991. Harper's Biochemistry., 547-562.

- [165] **McDowell, L.R.**, 2008. Vitamins in animal and human nutrition. John Wiley & Sons.
- [166] **McDowell, P.**, 1998. Vitamins in animal nutrition: Vitamin A. *Academic Press.*, pp. 10-54, San Diego. California.
- [167] **Dusso, A., González, E.A. and Martin, K.J.**, 2011. Vitamin D in chronic kidney disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **25**(4), 647-655.
- [168] **Wagner, C.L., Taylor, S.N. and Hollis, B.W.**, 2008. Does vitamin D make the world go'round'? *Breastfeeding Medicine*, **3**(4), 239-250.
- [169] **Kruse, K.**, 1995. Endocrine Control of Calcium and Bone Metabolism. In *Clinical Paediatric Endocrinology.*, **3**, 712-743. Ed. Brook CGD, Blackwell Science Ltd., Oxford.
- [170] **Ataş, A., Çakmak, A. and Soran, M.**, 2008. Vitamini metabolizması ve Rikets Hastalığı. *Bakırköy Tıp Dergisi*, **4**, 1-7.
- [171] **Kochupillai, N.**, 2008. The physiology of vitamin D: current concepts. *Indian Journal of Medical Research*, **127**(3), 256.
- [172] **Hatun, Ş., Bereket, A., Çalıkoğlu, A.S., Özkan, B.G.D.**, 2003. Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nütrisyonel rikets. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **46**(3), 224-241.
- [173] **Thomas, M.K., Lloyd-Jones, D.M., Thadhani, R.I., Shaw, A.C., Deraska, D.J., Kitch, B.T., Vamvakas, E.C., Dick, I.M., Prince, R.L. and Finkelstein, J.S.**, 1998. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *New England Journal of Medicine*, **338**(12), 777-783.
- [174] **Bikle, D.**, 2009. Nonclassic actions of vitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **94**(1), 26-34.
- [175] **Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon, R.O., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y. and Myers, G.L.**, 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*, **107**(3), 499-511.
- [176] **Halliwell, B.**, 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, **16**(1), 33-50.
- [177] **Meran, İ., Köylüoğlu, O. and Tarakçıoğlu, M.**, 2001. E Vitamini ve Klinik Önemi. *İbni Sina Tıp Dergisi*, **6**, 66-72.
- [178] **Coppola, R., Capasso, M., Vendemmia, M., Cioffi, C. and Vendemmia, S.**, 2004. Vitamin K: yesterday, today, tomorrow. *Pediatrica Medica E Chirurgica*, **26**(5), 389.

- [179] http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae 22.02.14
- [180] **Shuler, M.L. and Kargi, F.**, 2002. Bioprocess engineering. *Prentice Hall New York*.
- [181] **Hasenekeoğlu, İ., Yeşilyurt, S.**, 2002. Mikrobiyoloji., 317, Erzurum.
- [182] **Dickinson, J.R. and Schweizer, M.**, 2004. Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *CRC Press*.
- [183] **Goffeau, A., Barrell, B., Bussey, H., Davis, R., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J., Jacq, C. and Johnston, M.**, 1996. Life with 6000 genes. *Science*, **274**(5287), 546-567.
- [184] www.genedb.org 22.02.14
- [185] **Pekin, B.**, 1980, Biyokimya Mühendisliği (Temel ilkeler), E.Ü., Kimya Fak. Yayınları, İzmir.
- [186] **Walker, G. M.**, 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons., England.
- [187] **Dilsiz, N., Celik, S., Yılmaz, O. and Dıġrak, M.**, 1997. The effects of selenium, vitamin E and their combination on the composition of fatty acids and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochemistry and Function*, **15**, 265-270.
- [188] **Hsu, B., Coupar, I.M. and Ng, K.**, 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*, **98**(2), 317-328.
- [189] **Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.**, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, **95**(2), 351-358.
- [190] **Ellman, G.L.**, 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**(1), 70-77.
- [191] **Classics Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R.**, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem*, **193**, 265.
- [192] **Hara, A. and Radin, N.S.**, 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, **90**(1), 420-426.
- [193] **Christie, W.W.**, 1989. Gas chromatography and lipids. Oily Press.
- [194] **Tvrzická, E., Vecka, M., Staňková, B. and Žák, A.**, 2002. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, **465**(1), 337-350.
- [195] **Katsanidis, E. and Addis, P.B.**, 1999. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**(11), 1137-1140.

- [196] **Satyanarayana, M., Tiwari, P., Tripathi, B.K., Srivastava, A. and Pratap, R.,** 2004. Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**(5), 883-889.
- [197] **Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell Online*, **2**(4), 279-289.
- [198] **González, M.J., Miranda-Massari, J.R., Mora, E.M., Guzmán, A., Riordan, N.H., Riordan, H.D., Casciari, J.J., Jackson, J.A. and Román-Franco, A.,** 2005. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integrative Cancer Therapies*, **4**(1), 32-44.
- [199] **Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A.C., Lopes, S.C., Antunes, F., Cyrne, L. and Marinho, H.S.,** 2008. H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1778**(4), 1141-1147.
- [200] **Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L. and Marinho, H.,** 2004. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS letters*, **578**(1), 152-156.
- [201] **Matias, A.C., Pedroso, N., Teodoro, N., Marinho, H.S., Antunes, F., Nogueira, J.M., Herrero, E. and Cyrne, L.,** 2007. Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*, **43**(10), 1458-1465.
- [202] **Tafforeau, L., Le Blastier, S., Bamps, S., Dewez, M., Vandenhoute, J. and Hermand, D.,** 2006. Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF. *The EMBO Journal*, **25**(19), 4547-4556.
- [203] **McDonough, V.M. and Roth, T.M.,** 2005. Growth temperature affects accumulation of exogenous fatty acids and fatty acid composition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **86**(4), 349-354.
- [204] **Ntambi, J.M.,** 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*, **40**(9), 1549-1558.
- [205] **Rimoldi, O.J., Finarelli, G.S. and Brenner, R.R.,** 2001. Effects of diabetes and insulin on hepatic $\Delta 6$ desaturase gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **283**(2), 323-326.
- [206] **Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoeckl, J.P., Lan, H., Kendzierski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M. and Attie, A.D.,** 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(17), 11482-11486.
- [207] **Martin, C.E., Oh, C.-S. and Jiang, Y.,** 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1771**(3), 271-285.

- [208] **Bencheekroun, K. and Bonaly, R.,** 1992. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in the presence of surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**(5), 673-678.
- [209] **Rosi, I. and Bertuccioli, M.,** 1992. Influences of Lipid Addition on Fatty Acid Composition Of *Saccharomyces cerevisiae* And Aroma Characteristics Of Experimental Wines1. *Journal of the Institute of Brewing*, **98**(4), 305-314.
- [210] **Arias Abrodo, P., Margolles Cabrales, I., Mangas Alonso, J.J. and Blanco-Gomis, D.,** 2005. Fatty acid composition of cider obtained either by traditional or controlled fermentation. *Food Chemistry*, **92**(1), 183-187.
- [211] **Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A. and Rozes, N.,** 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, **85**(1), 127-136.
- [212] **Gurvitz, A., Hamilton, B., Ruis, H., Hartig, A. and Hiltunen, J.K.,** 2001. Degradation of conjugated linoleic acid isomers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1533**(2), 81-85.
- [213] **Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A. and Rozès, N.,** 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, **121**(2), 169-177.
- [214] **Tan, T., Zhang, M. and Gao, H.,** 2003. Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**(4), 366-370.
- [215] **Zhang, B., He, X., Tie, C. and Liu, Y.,** 1999. The construction of high ergosterol-production strains and study of the optimal conditions for culture. *Chinese Journal Of Biotechnology-Chinese Edition-*, **15**, 51-57.
- [216] **Pichova, A., Beran, K., Běhalová, B. and Zajíček, J.,** 1985. Ergosterol synthesis and population analysis of a fed-batch fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia microbiologica*, **30**(2), 134-140.
- [217] **Kagan, I.A., Michel, A., Prause, A., Scheffler, B.E., Pace, P. and Duke, S.O.,** 2005. Gene transcription profiles of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with plant protection fungicides that inhibit ergosterol biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **82**(2), 133-153.
- [218] **Cobon, G.S. and Haslam, J.,** 1973. The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **52**(1), 320-326.

- [219] **Zinser, E., Paltauf, F. and Daum, G.,** 1993. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, **175**(10), 2853-2858.
- [220] **Shang, F., Wen, S., Wang, X. and Tan, T.,** 2006. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, **122**(3), 285-292.
- [221] **Gao, H. and Tan, T.,** 2003. Fed-batch fermentation for ergosterol production. *Process Biochemistry*, **39**(3), 345-350.
- [222] **Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Asim kaplancikli, Z., Demirci, F. and Iscan, G.,** 2008. Studies on hydrazone derivatives as antifungal agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **23**(4), 470-475.
- [223] **Jones, D.P., Mody Jr, V.C., Carlson, J.L., Lynn, M.J. and Sternberg Jr, P.,** 2002. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**(9), 1290-1300.
- [224] **Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A.,** 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, **368**(1), 73-76.
- [225] **Penninckx, M.,** 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**(9), 737-742.
- [226] **Lee, J.H., Choi, I.Y., Kil, I.S., Kim, S.Y., Yang, E.S. and Park, J.-W.,** 2001. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1526**(2), 191-198.
- [227] **Yamaguchi, S., Sakurada, S. and Nagumo, M.,** 1994. Role of intracellular SOD in protecting human leukemic and cancer cells against superoxide and radiation. *Free Radical Biology and Medicine*, **17**(5), 389-395.
- [228] **Lushchak, V., Semchyshyn, H., Mandryk, S. and Lushchak, O.,** 2005. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **441**(1), 35-40.
- [229] **Lushchak, V.I. and Gospodaryov, D.V.,** 2005. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International*, **29**(3), 187-192.
- [230] **Ruis, H., Koller, F. and Scandalios, J.,** 1997. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences. *Cold Spring Harbor Laboratory Press pp.*309-342, New York.

- [231] **Cardoso, L.A., Ferreira, S.T. and Hermes-Lima, M.,** 2008. Reductive inactivation of yeast glutathione reductase by Fe (II) and NADPH. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **151**(3), 313-321.
- [232] **Hermes-Lima, M., Santos, N.C., Yan, J., Andrews, M., Schulman, H.M. and Ponka, P.,** 1999. EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone OH formation by the Fenton reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1426**(3), 475-482.
- [233] **Gutierrez-Correa, J. and Stoppani, A.,** 1997. Inactivation of yeast glutathione reductase by Fenton systems: effect of metal chelators, catecholamines and thiol compounds. *Free Radical Research*, **27**(6), 543-555.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buket ERZEN

Doğum Yeri : ELAZIĞ

Doğum Yılı : 1980

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

İlkokul: Elazığ Dumlupınar İlkokulu(1987-1992)

Ortaokul: Elazığ Mezre Ortaokulu(1992-1995)

Lise : Elazığ Anadolu Lisesi (1995-1999)

Lisans : Elazığ Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü(1999-2003)

Tezsiz Yüksek Lisans: Elazığ Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü(2004-2005)

Tezli Yüksek Lisans: Elazığ Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
Zooloji Anabilim Dalı (2005-2008)

Doktora: Elazığ Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel
Biyoloji Anabilim Dalı (2008-2013)

İş Deneyimi:

2011- Uzman, Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü,
Elazığ.