

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

***Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Bornm'in METHANOL
EKSTRAKTININ ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat ŞAHİN

Kimya Anabilim Dalı

Programı: Biyokimya

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sait ÇELİK

ŞUBAT -2010

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Bornm'in METHANOL
EKSTRAKTININ ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat ŞAHİN

(07117112)

Kimya Anabilim Dalı

Programı: Biyokimya

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15 / 01 / 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 05 / 02 / 2010

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Sait ÇELİK (F.Ü)

Diğer Juri Üyeleri Doç.Dr.Mustafa KARATEPE (F.Ü)

Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)

ŞUBAT - 2010

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmam süresince, bana çalışma ortamı sağlayan gerek bilimsel ve gerekse manevi konuda benden desteklerini esirgemeyen, bana her zaman gösterdiği ilgi, sabır ve iyi niyeti için danışman hocam Prof. Dr. Sait ÇELİK'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Dicle Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyoorganik Kimya Laboratuvarına adım attığım ilk andan itibaren benden yardımlarını esirgemeyen, Laboratuvar çalışmalarında bana destek olan hocam Doç. Dr. Göksel KIZIL'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Biyoorganik kimya laboratuvarında çalışma imkanı sağladığı için başta Doç. Dr. Murat KIZIL olmak üzere deneyleri yapmada bana yardımcı olan Dr. Murat YAVUZ'a, Arş. Gör. Bircan ÇEKEN'e, Sevil TANRIKUT'a ve Mihdiye PİRİNCİOĞLU'na teşekkür ederim.

Yaşamımın her aşamasında bana hep destek olup, sevgi ve ilgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen aileme de, vefa gereği olarak, teşekkür etmeyi bir görev olarak bilmekteyim.

Murat ŞAHİN
ELAZIĞ-2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
ÇİZELGELERİN (TABLOLARIN) LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Doğal Antioksidanlar.....	4
1.1.1. Vitamin E.....	5
1.1.2. Vitamin C.....	5
1.1.3. Karotenler.....	6
1.1.4. Flavonoidler.....	6
1.1.5. Fitosteroller.....	7
1.1.6. Fenolik Bileşikler.....	7
1.1.7. Kumarinler.....	8
1.2. Serbest Radikaller.....	8
1.3. Reaktif Oksijen Türleri.....	9
1.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	9
1.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	10
1.3.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$).....	12
1.4. Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Kaynağı.....	13
1.4.1. Serbest Radikallerin Etkileri.....	13
1.4.2. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri.....	14
1.4.3. Proteinler Üzerine Etkileri.....	15
1.4.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	15

1.4.5. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri.....	16
1.5. Oksidatif Hasar Sonucu Oluşan Hastalıklar.....	16
1.5.1. Yaşlanma.....	16
1.5.2. Ateroskleroz.....	17
1.5.3. Kanser.....	17
1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	18
1.6.1. Antioksidan Enzimler.....	19
1.6.1.1. Katalaz.....	20
1.6.1.2. Süperoksit Dismutaz.....	20
1.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz.....	21
2. MATERYAL VE METOD.....	22
2.1. MATERYAL.....	22
2.1.1. Kullanılan Bitkinin Özellikleri ve Yayılımı.....	22
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
2.1.3. Kullanılan Aletler.....	22
2.2. METOD.....	23
2.2.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	23
2.2.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini.....	23
2.2.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi.....	24
2.2.4. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi.....	25
2.2.5. DNA Agaroz Jel Elektforezi.....	25
2.2.5.1. DNA Agaroz Jelin Hazırlanması.....	26
2.2.5.2. Agaroz Jel Elektforezi Yapılması.....	26
2.2.6. İstatistiksel Analiz.....	27
3. BULGULAR.....	28
3.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini.....	28
3.2. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi.....	29
3.3. Lipid Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi.....	31
3.4. DNA Agaroz Jel Elektforezi.....	33

	<u>Sayfa No</u>
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
5. KAYNAKLAR.....	40
6. ÖZGEÇMİŞ.....	46

ÖZET

Aromatik bitkiler açısından oldukça zengin olan Labiatae familyasının üyelerinden *Sideritis* cinsi, 46 tür 53 taksondan oluşmaktadır. İçerdiği taksonlardan 42 tanesi endemiktir. “Dağ çayı ve Yayla çayı” olarak isimlendiren *Sideritis* bitkisi Türkiye Florası’nda oldukça dikkat çekici bir özelliğe sahip olup çay ve halk ilacı olarak eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, sideritis bitkisinin metanol ekstraktının antioksidan aktivitesi ve DNA ‘yı radikallerden koruma etkisi incelendi. Bitkinin antioksidan aktiviteleri in vitro sistemde farklı antioksidan testler kullanılarak bakıldı. Antioksidan aktivite için toplam fenolik bileşen miktarı, DPPH radikalini söndürme gücü ve sıçan beyni homojenatında lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelendi.

Fenolik bileşikler antioksidan aktivite gösteren moleküllerdir. Toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemiyle belirlendi. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* bitkisinin metanol ekstraktının 1 mg’nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 179 ± 13 µg gallik aside eşdeğer olarak bulundu. 5–500 µg/ml derişim aralığında siderites bitkisinin DPPH radikalini söndürme gücünün $\% 7.5 \pm 0.70 - \%91.0 \pm 2.1$ arasında olduğu tespit edildi. *Sideritis* bitkisinin metanol ekstraktı $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ sisteminde güçlü lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi gösterdi. 0.25 mg/ml konsantrasyonda α - tokoferol ve bitki ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktiviteleri sırasıyla $\% 76.0 \pm 1.5$ ve $\% 66.0 \pm 1.3$ olarak bulundu.

Ekstraktın aynı zamanda plazmid DNA’yı hidroksi radikallerinin neden olduğu kesime karşı koruduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar sideritis bitkisinin antioksidan aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Sideritis*, Antioksidan Aktivite, DNA Hasarı, Lipid Peroksidasyonu.

SUMMARY

Screening Of Antioksidant Activities Of Methanol Extract Of *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Bornm's

The genus *Sideritis* (Labiatae) is represented by 46 species and 53 Taxa in Turkey, 42 Taxa being endemic. *Sideritis* are widely used as herbal tea and folk medicine in Turkey under the names dağ çayı and yayla çayı. In this study, the antioxidant properties of crude methanol extracts of *Sideritis libanotica* Labill ssp *linearis* was examined for its antioxidant potential and protective ability against DNA damage. The antioxidant activity of crude methanol extract of plant was evaluated by several in vitro systems such as determination of total phenolic compounds, DPPH radical scavenging activity and lipid peroxidation in rat brain homogenate.

Phenols are very important plant constituents due to their radical scavenging ability. The total phenolic content of extract was quantified with the Folin-Ciocalteu reagent and total phenolic content of one-miligram of methanol extract was equivalent to 179 ± 13 .

The DPPH radical scavenging ability of crude methanol extract of *sideritis* was found to be in the range of 7.5 ± 0.70 % - 91.0 ± 2.1 % at the concentration range between 5-500 $\mu\text{g/ml}$. Methanol extract of *Siderits* showed strong inhibitory activity toward lipid peroxidation of rat liver homogenate induced by $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ system.

The inhibition of lipid peroxidation by α - tokoferol and methanol extract of *Sideritis* was found to be 76.0 ± 1.5 % and 66.0 ± 1.3 %, respectively. The extract was also protected plasmid DNA from cleavage induced by hydroxyl radicals. These results showed *sideritis* exhibits antioxidant activity.

Key Words: *Sideritis*, Antioxidant activity, DNA damage, lipid peroxidation

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. <i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>linearis</i> (Bentham) Bornm.....	3
Şekil 2.2.3. DPPH radikalinin indirgenmesi.....	24
Şekil 3.1. <i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>linearis</i> (Bentham) Bornm'ın metanol ekstraktının gallik asitin artan derişimlerine karşılık ölçülen absorbans değerleri.....	28
Şekil 3.2. <i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>linearis</i> (Bentham) Bornm'ın metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini söndürme aktivitesinin spektrometrik analiz verileri için Pozitif kontrol olarak α - tokoferol ve BHT kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.....	30
Şekil 3.3. <i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>linearis</i> (Bentham) Bornm'ın metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarda Lipid Peroksidasyonunu önleme aktivitesinin spektrometrik analiz verileri için Pozitif kontrol olarak α - tokoferol kullanıldı. Veriler üç deney(n=3) sonucunun ortalamasıdır ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.(p>0.05).....	32
Şekil 3.4. Kuyucuklardaki pBluescript M13 + plazmid DNA'sının Form I, Form II ve Form III yüzdeleri (A). <i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>Linearis</i> (Bentham) Bornm 'ın metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki supercoiled DNA'yı H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan $\cdot$ OH'ne karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi (B).....	34

ÇİZELGELERİN (TABLOLARIN) LİSTESİ

Sayfa No

- Tablo 3.2. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Bornm.'in metanol ekstraktı ile hazırlanan, pozitif kontrol olarak BHT ve α -tokoferol 'ün kullanıldığı DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir.(n=3) 29
- Tablo 3.3. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Bornm.'in metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ve pozitif kontrol olarak α -tokoferol 'ün kullanıldığı lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir.(n=3) 31

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin Fosfat
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
BHA	: Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
DMSO	: Dimethyle Sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetra Asetikasit
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG-R	: Glutasyon Redüktaz
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
LO	: Lipid Radikali
LDL	:Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OK-LDL	: Okside-LDL
PLGSH-Px	: Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz
RNA	: Ribonükleik Asit
RO	: Primer Radikal
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismütaz
SD	: Standart Sapmalar
SL	: Sideritis Libanotica Labill. ssp. linearis (Benth) Bornm
TBA	: 2-Tiyobarbitürik Asit
TBHQ	: Tersiyer Bütil Hidrokinon
TCA	: Trikloroasetikasit
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit ile Reaksiyon Veren Maddeler
UV	: Ultraviyole Işın

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, Türkiye bitkilerinin antioksidan etkilerinin taranması amacıyla yapılan ve halk arasında çay olarak yaygın olarak kullanılan bitkilerin başında gelen *Sideritis* türlerinden olan *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Bornm bitkisi materyal olarak kullanılmıştır. Sekiz tanesi endemik olan toplam on *Sideritis* türünden (*S. amasiaca* Bornm., *S. germanicopolitana* ssp. *germanicopolitana* Bornm., *S. vulcanica* Hub.-Mor., *S. dichotoma* Huter, *S. armeniaca* Bornm., *S. cilicica* Boiss.&Bal., *S. phlomoides* Boiss.& Bal., *S. scardica* Griseb., *S. galatica* Bornm., *S. taurica* Stephan ex Willd.) hazırlanan ekstrelerin antioksidan etkileri incelenmiştir. Ekstrelerin antioksidan etkileri *in vitro* olarak lipit peroksidasyonları Rancimat testi ile ve serbest radikal süpürücü etkileri ise DPPH yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanılan BHT'nin antioksidan etkileri ile karşılaştırılmıştır [1]. Ayrıca elde edilen ekstrelerin total fenol miktarları belirlenerek fenolik bileşiklerin varlığı YBSK analizi ile tespit edilmiştir.

Sideritis türlerinden endemik olan sekiz türü *S. phlomoides*, *S. vulcanica*, *S. germanicopolitana* ssp. *germanicopolitana*, *S. scardica*, *S. amasiaca*'nın uçucu yağ, *S. germanicopolitana* ssp. *germanicopolitana* ve *S. dichotoma*'nın ise yağ asidi içerikleri başka araştırmacılar tarafından daha önce yayınlanmıştır [2]. Yine başka bir çalışmada, Krimer ve Arkadaşları, Türkiye florasına ait 50 *sideritis* türünün uçucu yağ bileşenlerini GC/MS ile analiz etmişlerdir. Bu çalışma sonucu bu bitki türlerinin mono ve sesquiterpence zengin olduğunu gözlemlemişlerdir [3]. Başka bir çalışmada ise, Nakiboğlu ve Arkadaşları *Sideritis sipylea* bitkisinin antioksidant aktivitesine bakmışlardır. Antioksidan aktivite tayini için toplam fenolik içerik ve DPPH radikalini söndürme yeteneğini incelemişlerdir. *Sideritis sipylea*'nın antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır [4]. Chalcat ve Özcan çalışmalarında, *Sideritis* türlerinden olan (*Sideritis Erythrantha* Boiss.& Heldr.Var.*Erythrantha*) bitkisinin uçucu yağlarının bileşenlerini aydınlatmışlardır. Bitkinin yaklaşık 60 bileşenini bulmuşlardır. Bu bitkinin başlıca bileşeninin %25.13 oranında β -pinene olduğunu saptamışlardır [5].

Tepe ve Arkadaşları ise Türkiye florasına ait 4'ü endemik 5 farklı bitkinin (*Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham)Borm., *Centaurea mucronifera* DC.

and *Hieracium cappadocicum* Freyn) metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesine bakmışlardır. DPPH ve β -karoten /linoleik asit testlerini uygulamışlardır. Bu çalışmada *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* bitkisinin IC_{50} değerinin 109 ± 0.43 olarak bulmuşlardır [6].

Yeşilyurt ve Arkadaşları *Salvia cedronelle* Boiss bitkisinin toprak üstündeki kısımlarının aseton ekstraktının toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid bileşen miktarını ilk defa araştırmışlardır. Antioksidan potansiyel in vitro'da üç farklı test kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunlar; toplam antioksidan aktivite için β -karoten – linoleik asit sistemi, radikal söndürme aktivitesi için DPPH, Metal şelatlama için Fe^{+2} – ferrozine test sistemleridir. Yüksek derecede toplam fenolik bileşen içeriği, güçlü radikal söndürme gücü ve demir şelatlama etkisi gözlenmiştir. Bununla birlikte β -karoten –linoleik asit test sisteminde lipid peroksidasyonunun gözlenmediği bildirilmektedir. Fitokimyasal analizler sonucu p-hydroxyphenylethyl docosanoate, oleanolik asit ve betulinik asitle birlikte yeni kumarin (3-methoxy–4-hydroxy-methyl coumarine) elde edilmiştir [7]. Yine başka bir bitki çalışmasında ise, Tepe ve Arkadaşları tarafından *C. origanifolium* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücü sistemleriyle ekstraktlarının ve esansiyel yağlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini in vitro olarak araştırılmıştır. Esansiyel yağı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterirken diğer polar olmayan ekstraktlar ve alt fonksiyonları ılımlı antimikrobiyal aktivite göstermişler ancak polar ekstraktlarının neredeyse hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir. 2,2-difenil–1-pikrilhidrazil (DPPH) ve β -karoten-linoleik asit testleriyle antioksidan aktiviteleri incelenmiş olup, polar ekstraktlar, polar olmayan ekstraktlara göre daha fazla serbest radikal söndürme aktivitesi belirlenmiştir [8]. Liu ve Arkadaşları, *Gingko biloba* endofilik *Xylaria* sp. XY–28 meyvesinin antioksidant aktivitesini çeşitli çözücü sistemlerde ölçmüşlerdir. Toplam fenolik bileşeni en fazla olan metanol ekstraktı 54.51 ± 1.05 mg GAE/G kuru ağırlık ve en düşük olan hegzan ekstraktı 9.71 ± 0.57 mg GAE/g kuru ağırlık olarak tespit etmişlerdir [9].

Chua ve Arkadaşları, *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. Bitkisinin butanol fraksiyonunun toplam fenolik bileşen miktarına bakmışlar ve 496,7 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir [10]. Topçu ve Arkadaşları, *Pistacia terebinthus* L. subsp. *terebinthus* L. meyvelerinden elde edilen metanol ekstraktının toplam flavonoid bileşen miktarına bakmışlar ve metanol ekstraktında 22.60 ± 0.96 μ g QUE/mg flavonoid ekstraktı tespit etmişlerdir [11]. *Sideritis* türlerinin uçucu yağ bileşenleri, uçucu yağlarının veya crude ekstraktlarının

antimikrobiyal veya antioksidan aktiviteleri ile ilgili çalışmalar bazı araştırmacılar tarafından yapılmıştır. Bununla beraber *Sideritis* türlerinin lipid peroksidasyonu veya DNA kesimini önlemesi üzerine etkisi ile ilgili araştırmalara rastlanmamıştır. Bizim bu çalışmadaki amacımız, İç Anadolu bölgelerinde yetişen *Sideritis libanotica* Labill ssp. *linearis* bitkisinin metanol ekstraktının antioksidan ve DNA'yı serbest radikallerden koruma etkilerini araştırmaktır. *Sideritis libanotica* bitkisinin metanol ekstraktının antioksidan aktivitesi *in vitro* sistemde farklı antioksidan testler kullanılarak araştırıldı.



Resim.1. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Benth) Bornm

1.1. Doğal Antioksidanlar

Sentetik antioksidanların gıdalardaki kullanımı 1940'lı yıllarda BHA ve gallik asidin esterlerinin oksidasyonu önlediklerinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Demir ve bakır gibi transisyon metallerinin zararlı etkileri sitrik asit (CA), etilendiamintetraasetikasit (EDTA) veya onların türevlerine metal deaktivatör veya kelat ajanı olarak etki ettikleri ondan sonra bulunmuştur [12]. 1954'te ABD'de BHT'nin gıdalarda kullanılmasına müsaade edilmiştir. Tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) 1972'de ticari ölçüde kullanılmaya başlamıştır. Sentetik antioksidanların muhtemel karsinogenik etkileri büyüyen bir tepkiye neden olmaktadır. Böylece Japonya ve çok sayıdaki diğer ülke BHA'nın gıdalarda kullanılmasına izin vermemektedir. TBHQ'nun da Kanada, Japonya ve Avrupa ülkelerinde kullanımına izin verilmemektedir. Bu yüzden sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidanların kullanımı için genel bir istek mevcuttur. Fenolik maddeler doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bu maddelerin, besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bu nedenle uzun yıllardır besinlerin koku ve tad gibi özelliklerini arttırmak için katkı olarak kullanılan baharat ve aromatik bitkiler giderek önem kazanmaktadır.

Aromatik bitkiler açısından oldukça zengin olan Labiatae familyasında yer alan *Sideritis* cinsinin Türkiye florasındaki revizyonu, A. Huber-Morath tarafından yapılmıştır. Bu familyanın üyelerinden *Sideritis* cinsi, 46 tür 53 taksondan oluşmaktadır. İçerdiği taksonlardan 39 tanesi endemik olan bu cins, % 78.2'lik endemizm oranı ile Türkiye Florası'nda oldukça dikkat çekici bir özelliğe sahiptir [13]. *Sideritis* türlerinin toprak üstü kısımları çay ve halk ilacı olarak eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu türlerin antispazmodik, antifeedant (böceklerde iştah önleyici), karminatif, analjezik, sinir sistemi stimulanı, sedatif, antitussif ve antikonvulzan etkilere sahip olduğu kayıtlıdır [14]. Ayrıca halk arasında genellikle “Dağ çayı, Yayla çayı” olarak isimlendiren bu türlerden hazırlanan çaylar soğuk algınlığı, öksürük ve sindirim sistemi rahatsızlıklarda kullanılmakta ve bal yapıcı özelliklerinden dolayı arılarca da tercih edilmektedir. Bu türler fitokimyasal olarak birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve uçucu yağ, diterpenoid, yağ asidi, kumarin ve flavonoid grubu bileşiklerin varlıkları rapor edilmiştir. *S. phlomoides*'in Niğde dolaylarında çay olarak kullanıldığı, *S. scardica*'nın ise

dekoksasyon halinde Bulgaristan, Arnavutluk, Makedonya ve Rusya'da kullanıldığı kayıtlıdır [15].

1.1.1. Vitamin E

Çoğunlukla hücre membranında bulunur ve eğer görevini yapmazsa serbest radikaller membrana, DNA'ya ve diğer hücre komponentlerini etkiler. E vitamini (alfa tokoferol) normal reproduksiyon, kas işlevleri ve pek çok diğer vücut fonksiyonu için gereklidir. E vitamini süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirgeyen zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Vitamin E yükseltgendikten sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterirler.

Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller. Vitamin E selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır [16]

1.1.2. Vitamin C

Yıllardan beri yapılan pek çok araştırma, C vitamininin etkili bir anti-kanser ajanı olduğunu bulmuştur. Çalışmalar C vitamininin antioksidant özelliğinin kanseri yenmede birkaç yolla olduğunu savunmaktadır. Lipitlerin peroksidasyonunu önleyerek dejenerasyon ve yaşlanma olaylarında etkilidir. Yetişkin insanlarla yapılan bir çalışma bir yıl süreyle günlük 400 mg C vitamininin serumdaki lipid peroksitleri azalttığını göstermiştir. Vitamin C aynı zamanda DNA'ya verilebilecek serbest radikal hasarlarını da engellemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar C vitamininin antiaterojenik ve antikanserojen etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Zaitsev ve arkadaşları, C vitamininin arteriyel kolesterolün mobilizasyonunda ve kolesterolün safra asitlerine katabolizasyonunda hızlandırıcı rol oynadığını ve böylece kalp hastalıklarında koruyucu görevinin olduğunu belirtmişlerdir [17].

C vitamininin günlük hayatta en çok kullanımı antiviral ve antibakteriyel etkisine dayanmaktadır. C vitamininin hem kan lökositleri ve retikuloendotelial sistemin makrofajları tarafından yapılan fagositozis için gerekli olduğu, hem de interferon yapımını arttırdığı ve böylece immün cevap modülasyonunda rol oynadığı vurgulanmıştır [18].

Son yıllarda özellikle C vitamininin kanser hastalarında, hastanın direncini sağlayan birçok mekanizma yanında, kanser hücre sitotoksitesinde önemli rol oynayabileceğine ilişkin bazı bulgular elde edilmiş, antiviral aktivitesinden dolayı virüsler tarafından oluşturulan insan kanser türlerinde koruyucu ajan olduğu belirtilmiştir [19]. Böylece Pauling ve Cameron'un çalışmalarında da vurgulandığı gibi çok yüksek dozlarda C vitamini alınmasının kanserli hastaların tedavisinde yararlı olabileceği konusunda tartışmalar yapılmıştır [20].

Pauling ve Cameron, C vitamininin kanserdeki yerini işaret ederken, malign saldırıdan sorumlu olan lizozomal glikozidazların feedback inhibisyonunda gerekli olduğunu ve malign hücrelere karşı seçici bir sitotoksik etki oluşturduğunu savunmuşlardır. C vitamininin alımının artmasıyla intersellüler yapının dayanıklılığı da artmaktadır. Askorbat tümörlerin etrafında koruyucu bir kapsül oluşturmakta, böylece neoplastik işgale karşı fibröz bir engel meydana gelmektedir. Bu ve immün mekanizmayı destekleyici rollerinden dolayı malign tümörler etrafında oluşturulan infiltrasyon ve metastaz ile meydana gelen akıma karşı dokunun dayanıklılığı fazlaşmaktadır [21].

1.1.3. Karotenler

Doğada yaygın olarak bulunan ve hücreleri korumada önemli görevleri olan pigmentlerdir [22]. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tesbit edilmiştir [23].

1.1.4. Flavonoidler

Flavonoidler bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Bitkilerin bol ve kısa dalga boylu güneş ışığına rağmen gelişmeleri bu pigmentleri çok fazla miktarda sentezlemesiyle mümkün olabilmektedir. Güneş ışınlarının etkisi ile bitki yaprak ve dokularında fenolik maddeler 'inde sentezlenmesini sağlayan *fotomorfogenez* reaksiyonları başlar. İnsanlarda flavonoidler, bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır. Bitki hücre ve dokularında basit fenolik bileşiklerin önemli bir kısmı, fenolik asitler ve fenilpropanoidlerin sentez yollarının ara ve son ürünleridir [24].

Vasküler bitkilerde bulunan flavonoidlerin, 6400'den fazla farklı yapısı aydınlatılmış olup [25], bitkilerin taç yapraklarının ve meyvelerinin renk oluşumuna etken maddelerden olması [26], UV ve çeşitli zararlılara karşı bitkiyi koruması, otçul

hayvanlara karşı verdiği tiksindirici özelliği yanında, hayvan ve insan üzerinde göstermiş olduğu antioksidant [27], antikanser, östrojenik, antifungal, antiviral [28], antibakteriyal [29] ve son yıllardaki araştırmalarda elde edilen kalp hastalıklarında göstermiş olduğu olumlu etkisi gibi canlılar üzerinde birçok fizyolojik özellik gösterdiği kanıtlanmıştır.

1.1.5. Fitosteroller

Fitosteroller doğada serbest halde veya yağ asitleri, fenolik asitler veya glikosidlerle esterleşmiş hallerde bulunurlar [30]. Genel olarak, bitkisel gıdalarda bulunan fitosteroller ve fitostanoller, 4-desmetil steroller kategorisinde yer almaktadırlar. Fitostanollerden yaygın olanlar ise sitostanol ve kampestanol'dür [31]. Fitosteroller, kolesterolün bağırsaktaki emilimini engelleyerek, kandaki toplam ve LDL-kolesterol seviyelerini düşürücü etki göstermektedir. Bu faydanın temin edilebilmesi için diyetle 1g/gün fitosterol alınması gerekmektedir . Günlük alınan fitosterol miktarının 2–3 g olması halinde en üst seviyede etki oluştuğu bildirilmektedir[32]. Kolesterol emiliminde önemli azalma sağlanabilmesi için yaklaşık 150 mg/gün ve kanda LDL-kolesterol düzeyinin düşürülebilmesi için bu miktara yaklaşık 800 mg/gün ilave fitosterol alınması gerektiği ifade edilmektedir [33]. Söz konusu miktarların alınabilmesi için günlük diyetin çok iyi hazırlanması veya diyetin fitosterollerle zenginleştirilmiş gıdalarla desteklenmesi gerekmektedir. Fitosterollerin beslenmedeki tüketim düzeylerinin bilinmesinde ve insan sağlığına bu minör bileşiklerin doğal konsantrasyonlardaki etkilerinin değerlendirilmesinde bitkisel gıdaların fitosterol içeriklerine ve kompozisyonlarına ait verilere gereksinim bulunmaktadır [34].

1.1.6. Fenolik Bileşikler

Fenlik bileşikler bitkilerde doğal olarak oluşan maddelerdir. Bir veya daha fazla aromatik benzen halkaları ile bir veya daha fazla hidroksil gruplarının bir araya gelmesiyle oluşurlar. Fenolik bileşikler, asidiktir ve kolayca parçalanabilirler. Fenolik bileşikler bitkileri ultraviyole ışıklardan, hastalık ve zararlılardan korurlar. Renk ve aromaya katkıda bulunurlar, aynı zamanda büyümeye ve üretime yardım ederler. Bu doğal bileşiklerin çoğu bitkilerde belirlenmiştir [35].

Fenolik bileşikler bitki dokularının normal gelişimi sırasında enfeksiyon, yaralanma ve UV ışınlarına maruz kalma gibi stres koşulları altında sentezlenmektedir. Fenolik bileşiklerin dokulardaki ve hücrelerdeki düzeyleri daima aynı değildir. Farklı meyve ve

sebzelerin toplam fenolik bileşik içerikleri arasında geniş bir çeşitlilik vardır. Fenolik bileşiklerin antioksidant aktivitesi; serbest radikalleri temizlemesi ve hidrojen atomlarını veya elektronlarını vermesinden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin yapıları serbest radikallerin belirlenmesinde bir anahtardır. Ayrıca, fenolik bileşiklerin sağlığa faydaları onların emilimine ve metabolizmasına bağlıdır [36].

1.1.7. Kumarinler

Kumarinler, benzen ve α -piron halkasından meydana gelmiş fenolik bileşenlerdir. Warfarin iyi bilinen bir kumarindir, antikoagulant olarak kullanılır. Kumarinler makrofajları uyararak infeksiyon üzerinde indirekt etki yapar [37].

1.2. Serbest Radikaller

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron eklenmesiyle bu molekül güçlü bir toksine yani bir serbest oksijen radikaline dönüşür [38]. Bu bileşikler de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içerdikleri için kolayca diğer moleküllerle reaksiyona girerek onları tahrip edebilen bileşikler oluştururlar ve organizmada çok etkili bir hasar meydana getirirler [39].

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağın yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğerine). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hemde kullanışlı yapar.

Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur.

Normal koşullar altında bu serbest radikallerin yıkımı ve üretimi bitki hücresi içinde düzenlenmektedir. Buna rağmen çevresel stresler (yüksek ışık yoğunluğu, herbisitler, patojen saldırılar, kuraklık, tuzluluk, hava kirliliği vs.) sonucunda serbest radikaller ile antioksidan sistemin aktivitesi arasında denge bozulmakta ve protein denaturasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA mutasyonları da içine alan oksidatif hasarlar meydana gelmektedir [40].

1.3. Reaktif Oksijen Türleri

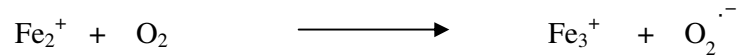
Moleküler Oksijen, temel halde eşleşmemiş iki elektronu olan kararlı bir radikaldir [41]. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS)'de denilmektedir[42].

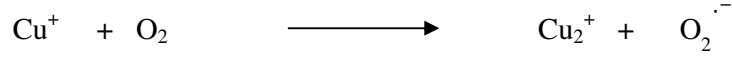
Reaktif Oksijen türleri (ROS) normal fizyolojik olaylar sırasında oluşmaktadırlar ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatıp, lipid peroksitlerin birikmesine öncülük edebilirler. Ancak, ROS antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılırlar. ROS oluşumu ve antioksidan sistem tarafından etkisizleştirilmesi arasında bir denge vardır. Patolojik durumlarda bu denge bozulup, ROS oluşumu Oksidatif strese neden olmaktadır. ROS ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik hücresel membranlar veya hücre içi moleküllerde oksidatif modifikasyonlara yol açar [43].

ROS aktifleşmemiş oksijenin çeşitli formlarıdır. Bu formlar, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($HO\cdot$), serbest radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen (1O_2)'dir [44,45]. Oksijenin bu oldukça reaktif ve zehirli türlere indirgenmesi sonucu zararlı etkiler oluşur [46].

1.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir.

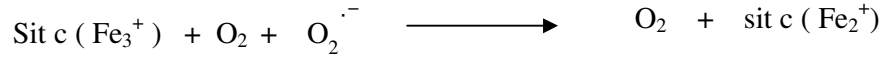




Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur.



Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ($\text{NO}^{\cdot}$) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit ($\text{NO}_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin ($\text{NO}^{\cdot}$) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur [47].

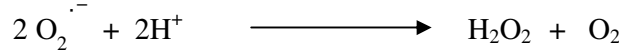
1.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.



Süperoksit radikalinin kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali ($\text{HO}_2^{\cdot}$) oluşturmak üzere protonlanır. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



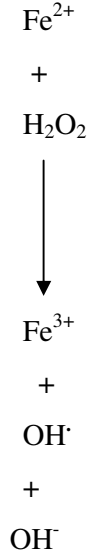
Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir.

Hidrojen Peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen Peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen Peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

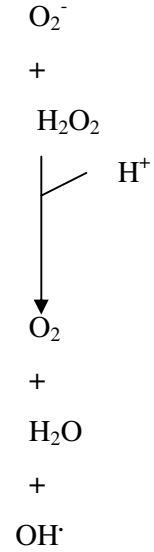
Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin

($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) oluşturur [48].

Fenton Reaksiyonu

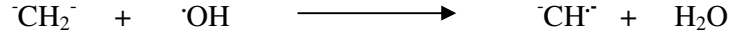
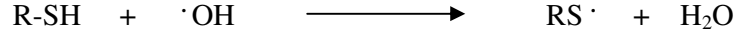


Haber – Weiss Reaksiyonu



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

Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($\text{RS}^{\cdot}$), karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}^{\cdot}$), organik peroksitler ($\text{RCOO}^{\cdot}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur [49].



1.4. Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Kaynağı

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle kazara etkileşirler ve sonuçta serbest oksijen radikalleri oluşur. Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondrial elektron transport zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikal üretimi artar [50].

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden (O_2) daha çok NAD^+ kullanılır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen perokside indirgenmektedir [51].

1.4.1. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Serbest radikallerin etkisiyle ortaya çıkan bozuklukların başında çeşitli zarlardaki lipid peroksidasyonu (LPO) gelmektedir. LPO, serbest radikaller tarafından başlatılan ve

zarların yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır [52].

Serbest radikaller ve oksijen türevi serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek tersinir veya tersinmez hasar meydana getirilebilmektedirler [53].

Kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyonlar, nörolojik sinir dejenerasyonları, Alzheimer, mutasyonlar ve kanser gibi temel hastalık proseslerinde çok büyük öneme sahip oldukları bu konulardaki çalışmalar ilerledikçe daha iyi anlaşılmaktadır [54]. Bunların iskemi, reperfüzyon, kanserogenez[55], yaşlanma[56] gibi temel hastalık proseslerinde çok büyük öneme sahip oldukları bu konulardaki çalışmalar ilerledikçe daha iyi anlaşılmaktadır

1.4.2. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri

Biyolojik zarların tümü, poliansatüre yağ asitleri ile amfipatik lipidler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde uzayan, lipid peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanan süreçtir [57].

Lipit peroksidasyonu, membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalının membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur [58]. Reaksiyon $\cdot\text{OH}$ radikalini ortadan kaldırır, fakat membranda “C” merkezli lipid radikali oluşur. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder [59]. 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. 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 [60].

1.4.3. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar sonucunda enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitesinin kaybı, protein agregasyonu ve immunojen aktivitede artış meydana gelir [61].

1.4.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonunun, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agrega olmalarına sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjiopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir [62]. Serbest radikaller, bu kabil etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psoriasis, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir [63]. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar [64]. Glikozaminoglikan olan ve sinovyal sıvının viskositesinde önemli rol oynayan hyalüronik asitin reaktif oksijen türleri ile etkilenmesi

ile bağ dokusu stabilitesi bozulur. Hyaluronik asit parçalanması inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovyal sıvının karakteristik bir özelliğidir. Gözün vitreous humourunda da bol miktarda hyluronik asit bulunur. Bunun da oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur [65].

1.4.5. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır [66]. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarına saldırabilir ve mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır.

Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer [67]. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir [68]. Reaktif oksijen türleri, DNA'nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenesis, hastalıklar ve yaşlanmada önemlidir [69].

1.5. Oksidatif Hasar Sonucu Oluşan Hastalıklar

Serbest radikallere bağlı olarak oluşan hasar kanser, aterosklerotik kalp damar hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve normal yaşlanma süreci de dahil olmak üzere insanlarda görülen birçok hastalığın patofizyolojisinden sorumlu tutulmaktadır.

1.5.1. Yaşlanma

Vücutta üretilen oksijen radikallerinin çok yönlü hasarlara neden olduğu artık kesin olarak bilinmektedir. Bu radikaller hücre zarlarının temel yapısında bulunan lipidleri, proteinleri, proteinlerdeki -SH gruplarını yükseltir, -S-S- gruplarını indirir, protein-protein çapraz bağlantıları oluşturur, peptidleri parçalar, aldehitlerle tepkir, özellikle aktif

merkezlerinde Fe-S bulunan enzimleri inaktive ederler. Nükleik asitlere de etki ederek temel yapıdaki çift sarmalın kırılmasına, yeni baz ve şeker gruplarının eklenmesine ve moleküller arası çapraz bağlanmalara, yani büyük hasarlara neden olurlar. Hücre hasarı hızı, reaktif oksijen radikallerinin üretim hızı, bunların ortamdaki atılma hızı ve hasar tamir hızına bağlıdır. Oksidatif hasar hızı arttıkça da yaşam süresi azalır. Mitokondride antioksidant korumanın artması yaşlanma işlemlerini geciktirir. Mitokondrial DNA mutasyonunun önlenmesi hücrenin solunum kapasitesini korur ve yaşlanmanın gecikmesi için avantaj oluşturur. Ayrıca serbest radikal tepkimelerinin yaşa bağlı olarak kardiyovasküler ve sinir sisteminde önemli bozulmalara neden olduğu kabul edilir. O halde radikal oluşturucu ve oksidatif hasar yapıcı etken ve maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması ile vücutta radikaller ve bunların sebep olduğu hasarlar azaltılarak yaşam süresi artırılabilir [70].

1.5.2.Ateroskleroz

Oksidatif hasarın temel özelliklerinden birisi lipid peroksidasyonudur. Ateroskleroz; damar duvarında kolesterol, lipid birikimi ve bağ doku artımı ile gelişen patolojidir [71]. Ateroskleroz ve komplikasyonları, batı toplumlarındaki gibi yaşlı nüfusun yoğun olduğu ülkelerde, en önemli ölüm sebebidir. Aterosklerozun başlangıcı lipoprotein birikimi ve modifikasyonu ile başlar. Yağlı çizgilenme aterosklerozun başlangıç lezyonudur. Bu erken lezyonların oluşumu en sık olarak arter duvarının intima bölgesindeki lipoprotein içeriğinin artmasından kaynaklanıyor görünmektedir. Aterosklerozun ilerlemesinde, mekanik zedelenmenin olduğu bölgede açığa çıkan oksijen radikalleri önemli bir role sahiptirler [72].

Serbest oksijen radikalleri, yeni üretilen endotel ve bağ doku hücreleri ile proteoglikan ve kollagen gibi bağ doku proteinleri üzerine zararlı etkiler yapmaktadırlar. Damar duvarında biriken lipidler ve kolesterol burada okside olarak kolesterol oksidasyon ürünlerine (oksisisterollere), LDL de okside-LDL (OK-LDL)'ye dönüşmektedir [73]. Okside LDL molekülleri, makrofajların çöpçü (scavenger) reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınıp, aterosklerotik lezyonların erken göstergesi olan köpük hücrelerinin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. OK-LDL, lipoksijenazı uyararak makrofajlardan O_2^- salgılamasına yol açmakta ve oksidatif zedelenmenin ilerlemesine neden olmaktadır. Böylece OK-LDL, inflamasyona, damar endotelinin zedelenmesine ve tromboza da yol açmaktadır [74].

1.5.3. Kanser

Oksidatif ve Serbest radikaller somatik hücrelerde DNA mutasyonunu gerçekleştirerek (başlangıç aşaması), tümörjenik hücrelerin yayılmasını hızlandırarak (gelişme aşaması) ve maling tümörleri kansere çevirerek (ilerleme aşaması) tüm aşamalarda kanser oluşumunu ve gelişimini tetiklerler. Reaktif oksijen türlerinin kanserin başlangıcında, gelişmesinde ve metastazında birçok etkisinin olduğu, kanser tedavisi ve önlenmesinde antioksidant kullanımının etkisini araştıran klinik çalışmalarda belirtilmektedir. Hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlamak için ROS seviyesinin düzenlenmesi gerekir. Aşırı antioksidan tüketimi de dengeyi bozup istenmeyen etkilerin meydana gelmesine neden olabilir. Bazı kemoterapi ilaçları ve radyoterapi yüksek seviyede ROS üreterek kanser hücrelerini öldürür, bundan dolayı antioksidant kullanımı bazı kanser tedavilerini engelleyebilir. Bununla birlikte bazı sonuçlar antioksidant kullanımının kemoterapide yan etkileri engellediğini ve uzun süreli tedaviyi gerektirdiğini göstermiştir [75]. Karsinogenezin ilk basamağı, DNA'nın dönüşümsüz hasarı ile başlar. DNA'nın oksidatif hasarı kimyasal veya yapısal olabilir [76]. Hidroksi radikali DNA molekülünün tüm komponentlerine, deoksiriboz omurgasına, pürin ve pürimidin bazlarına saldırır. Hidroksi radikallerinin deoksiriboz ile kimyasal reaksiyonu sonucu pürin ve pürimidin bazları açığa çıkar. Bu DNA baz ürünleri DNA'da mutajenik bölge meydana getirirler. En yaygın Oksidatif DNA bazı 8-hidroksideoksiguanozindir. Normal insan hücrelerinde yaklaşık olarak 10^5 guanidin kalıntısından bir tanesi 8-hidroksideoksiguanozine dönüşür [77]. 8-hidroksideoksiguanozin-deoksiadenozin hatalı çiftleşmesi sonucu olarak GC baz çifti, TA baz çiftine dönüşür [78]. Yüksek konsantrasyonlarda intraseellüler Ca^{2+} , proteinkinaz C ve S6-kinaz gibi diğer protein kinazları aktive eder. Hem protein kinaz hem de S6 kinaz çeşitli fosforilasyon olaylarında transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenlerler ve bunun sonucunda hücre çoğalmasını etkilerler. Karsinogenezin son basamağında kontrolsüz büyüme, bağışıklık denetiminden kurtulma, doku istilası ve metastazi gibi malingnat özellikler gelişir [79].

1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma

sistemleri' veya kısaca 'antioksidanlar' olarak bilinen; serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerin bir sınıfıdır [80]. Antioksidanları anlayabilmek için onların nötralize ettiği serbest radikallerin kaynağını ve neler yapabileceğini bilmemiz gerekir. Antioksidanlar olarak adlandırılan mikro besin maddeleri, yiyecekleri özellikle yağları oksidasyon ve bozulmaktan koruyan maddelerdir. Adlarından da anlaşılacağı üzere oksijenin diğer maddelerle birleşmesini önleyerek canlıdaki maddelerin okside olmasını engellerler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidan sistem bütün bunları yaparken temelde; serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere (DNA) ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar. Antioksidan özelliği bilinen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını özellikle bitkilerden alırken, bir kısmını vücut kendisi üretir. Antioksidanlar, endojen kaynaklı (doğal) ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim olanlar ve olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Hücrelerin hem sıvı hem membran kısımlarında bulunabilirler.

Endojen (Doğal) antioksidanlar:

—Enzimatik Antioksidanlar: Katalaz, Süperoksit Dismutaz, Glutasyon Peroksidaz

—Enzimatik olmayan Antioksidanlar : β -karoten, E vitamini, Askorbik asit, sistein, albumin, bilirubin, hemoglobin v.s.

Eksojen antioksidanlar:

Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz İnhibitörleri [81].

1.6.1. Antioksidan Enzimler

Zincir kırıcı antioksidanlar, peroksil radikalleri ile direkt olarak tepkimeye girerler ve zincir uzunluğunu mümkün olduğu kadar kısa tutarak peroksidasyonu engellerler. Antioksidanların fonksiyonları, genel olarak koruma, durdurma ve tamir olmak üzere 3 kısımda toplanabilmektedir. Radikal stresin başlangıcında meydana gelen primer radikal (RO), lipid radikallerin (LO) oluşumuna yol açmaktadır. Daha sonra oluşan lipid peroksil radikali, α -tokoferol radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Askorbik asit (vitamin C) ve α -tokoferol (vitamin E) membranı oksidatif hasara karşı koruyabilen önemli

antioksidanlardır. Askorbik asit tokoferoksil radikalini indirgeyerek tokoferolün radikal temizleme aktivitesini düzenlerken, askorbik asitin redoks durumu hücre içi GSH tarafından kontrol edilmektedir. Dolayısıyla, E vitamininin fonksiyonunun devamı ve rejenerasyonu için askorbik asit ve GSH'a ihtiyaç duyulmaktadır [82].

Oksijen radikallerinin etkisiyle ortaya çıkabilecek oksidatif hasarları önlemek amacıyla canlı sistem tarafından gerçekleştirilen pek çok korunma mekanizması vardır. Bunlar intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki gruba ayrılır [83]. İntrasellüler enzimlerin SOD, GSH-Px, glutatyon redüktaz (GSSG-R) ve katalaz (KAT) olduğu bilinmektedir. Sonraki savunma hattı ise ekstrasellüler nonenzimatik antioksidanlar tarafından oluşturulur. Bunlar; vitamin E, vitamin C, β -karoten, transferrin, seruloplazmin, albumin, haptoglobin gibi bileşiklerdir [84].

1.6.1.1. Katalaz

Katalaz (KAT), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 248,000 Dalton'dur. Daha çok peroksizomlarda lokalizedir. KAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır [85]. Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesini katalizleyen ve böylece hidrojen peroksitin hücrenel bileşiklere zarar vermesini engelleyen koruyucu bir enzimdir. Hidrojen peroksit, katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur. Katalaz, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak kullanılmaktadır [86].

1.6.1.2. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit Dismutaz enzimi (superoxide oxido reductase, EC 1.15.1.1) oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir defanstır. Süperoksit dismutaz'ın fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H_2O_2 ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir. Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

(1) Bakır ve Çinko içeren dismutazlar (Cu, Zn SOD) genel olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve kloroplastlarda bulunur. Tek disülfid bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerirler. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko; Co^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başlar.

(2) Mangan içeren dismutazlar (Mn SOD) prokaryotlarda ve mitokondri matriksinde bulunur. Birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır.

(3) Demir içeren dismutazlar (Fe SOD) prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn süperoksit dismutaza benzer yapıdadır [87].

1.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür [88]. Bu enzimin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Endotel hücrelerinde özellikle akciğerde en etkili enzimdir [89]. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir [90].

GSH-Px, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur [91]. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGSH-Px membran peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar [92]. Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazı (GSSG-R) katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür. GSH-Px'ın, hücredeki dağılımı, GSSG-R'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur [93].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kullanılan Bitkinin Özellikleri ve Yayılımı

Sideritis bitkisi Labiatae familyasının üyelerinden olup, 46 türü, 53 taksondan oluşmaktadır. *Sideritis* türlerinin toprak üstü kısımları çay ve halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Yerel adı ” Dağ çayı, yayla çayı, ada çayı, çay otu, çalba, dağ şalbası olarak isimlendirilen bu türlerden hazırlanan çaylar soğuk algınlığında, öksürükte, sindirim sistemi rahatsızlıklarında, iştahı açmada ve ağrıyı kesmede ağrı kesici olarak kullanılmakta olup bal yapıcı özelliğinden dolayı arılarca da tercih edilmektedir. Aromatik bitkiler açısından oldukça zengin olan *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Benth) Bornm, Labiatae familyasının bir üyesidir. Endemizm oranı yüksek olan cinsin Türkiye Florasında revizyonu, A. Huber–Morath tarafından yapılmıştır. İç Anadolu Bölgesinde yayılışı olan bitki 1000–1400 m yüksekliklerde yetişmekte olup Temmuz–Eylül ayları arasında çiçek açmaktadır.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Gallik asit, 1.1-Difenil–2-pikril-hidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Dimetil Sülfoksit (DMSO), Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), α - tokoferol, folin & ciocalteu’s fenol reaktifi, sodyum Karbonat (Na_2CO_3), demir–2-klorür (FeCl_2), demir–3-klorür (FeCl_3), askorbik asit, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), ferrozin, ferrisiyanit [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], trikloroasetikasit (TCA), deoksiriboz (DNA), 2-tiyobarbitürik asit (TBA), NaOH, , agaroz, Sigma, Aldrich ve Merck’den ticari olarak temin edildi.

2.1.3. Kullanılan Aletler

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

2.2. METOD

2.2.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bitki materyali Adana ili Tufanbeyli ilçesinde toplandı. Bitki Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, biyoloji bölümünden Prof. Dr. Selçuk Ertekin tarafından teşhis edildi. Teşhis edilen bitki örneği Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumunda (DUF No: 10621) saklandı. Bitki tüm kısımlarıyla (dal+yaprak+çiçek) alınıp blender yardımıyla iyice toz haline getirilip öğütüldü. Öğütülmüş bitkiden 20g alınıp 250 mL metanol ile 56 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözünmeyen kısımlar filtre edilip atıldı. Süzütünün çözücüsü evaporatörde uçuruldu. *Sideritis libanotica* Labill ssp.' den 8 g koyu yeşil renkli metanol ekstratı elde edildi.

2.2.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Fenolik bileşenler antioksidan aktivite gösteren moleküllerdir. BHT, quercetin, α -tokoferol ve gallik asit önemli fenolik bileşenlerdir. Ekstrakt içindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre tayin edildi [94]. Standart olarak gallik asit kullanıldı. Bu yöntemin dayandığı temel prensip gallik asit içindeki fenolik bileşen miktarını gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktları içindeki toplam fenolik bileşen miktarını gallik asite eşdeğer olarak hesaplamaktır [95]. Gallik asitin 5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlanarak, bu stok çözeltide 50–500 μ g/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çalışılan ekstraktın 1 mg/mL konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanıp, daha sonra hazırlanan gallik asit ve ekstrakt çözeltilerinden 40 μ L alınıp, üzerlerine 1160 μ L saf su ve 200 μ L folin&ciocalteu's fenol reaktifi (2.0 N) ilave edilip karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip, üzerine 600 μ L % 20'lik sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek, 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda karıştırıldı. Daha sonra 765 nm'de UV cihazında absorbans değerleri okundu. Kör olarak saf su kullanıldı.

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

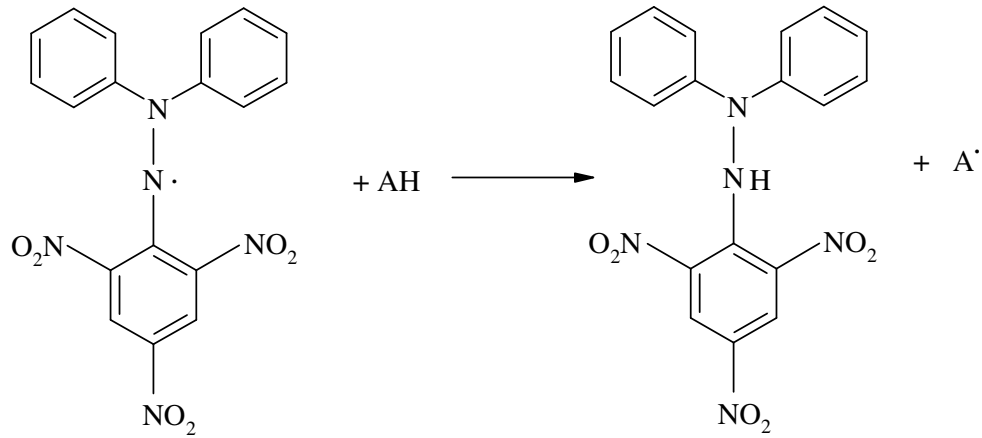
$$\text{Absorbans (A)} = 0,0015 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

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

2.2.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Antioksidant maddelerin DPPH radikalini söndürme etkileri, kendi hidrojenlerini radikale verebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. DPPH serbest ve kararlı bir radikaldir, 1 elektron veya hidrojen alarak kararlı diamagnetik bir moleküle dönüşür. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkânı sağladığından daha yaygın olarak kullanılmaktadır [96]. Bu metot absorbansın azalması temeline dayanır. DPPH üzerindeki ortaklanmamış elektron görünür bölgede 517 nm’de maksimum absorbans vermektedir.

Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki reaksiyon DPPH’in ortamdaki derişiminin azalmasına yani absorbansın düşmesine neden olur. Sonuçta oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H’dır (Şekil 2.2.3.). Bu olay reaksiyon karışımının renginin mordan sarıya dönmesiyle gözlenir.



Şekil 2.2.3. DPPH radikalinin indirgenmesi

Bitki ekstraktının 1 mg/mL’lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden seyreltmeler yapıldı. Seyreltilen bitki ekstraktından 3 mL alınarak üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi ve daha sonra 517 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise Bitki için Methanol, BHT ve α -tokoferol için ise Ethanol kullanıldı. Sonuç olarak artan ekstrakt

derişimine karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilip, % İnhibisyon değerleri aşığıdaki formül kullanılarak hesaplandı [97].

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

2.2.4. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine Wistar Albino dişi (♀) sıçan beyini homojenatı üzerinde in vitro bakıldı. 150 g ağırlığındaki sıçan beyni önce iyice ezildi sonra 120mM KCl içeren 50mM, Ph 7.4 fosfat tamponu içinde sonikatörde homojenize edildi. Daha sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernant -20 °C’de saklandı [98]. Hazırlanan beyin homojenatından (süpernatant) 300µL alındı üzerine sırayla 600µL bitki ekstraktı (0.025, 0.050, 0.100, 0.125, 0.250µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı). 300µL 10µM FeCl₃, ve 300µL 0.1µM Askorbik Asit Oksidasyonu başlatmak için ilave edildi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımın üzerine Proteinleri çöktürmek için 1500µL %28’lik TCA ve Malondialdehit oluşturmak için ise 380µL TBA (0.05M NaOH içinde %2’lik BHA içerecek şekilde) hazırlandı ve 100 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde soğutulduktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Son olarak 532 nm’de UV spektrofotometrisinde absorbans ölçüldü [99].

Pozitif kontrol olarak α-tokoferol kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise bitki ekstraktı için Saf su, α-tokoferol için ise ethanol kullanıldı. Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. %İnhibisyon değeri aşığıdaki formüle göre hesaplandı.

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

2.2.5. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroforez tekniği de bu prensibe dayanır. Nükleik asit parçalarının tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA’ların tanımlanabilmesi, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle genetik mühendisliği teknikleri ile DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden

sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden agaroz jel elektroforezi tekniği, moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır. Agaroz jelde örnekler yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir. DNA şeker fosfat omurgasından dolayı negatif yüklüdür ve bir elektriksel alana konulduğu zaman bu negatif yükünden dolayı katottan anoda doğru hareket eder. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan ·OH radikali ile etkileşmesi Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmektedir. Bu yöntemde bitki ekstraktının değişik konsantrasyon aralığında DNA'yı ·OH radikaline karşı koruma etkisine bakıldı. Pozitif kontrol olarak ·OH radikali söndürücü etkileri olduğu bilinen DMSO (Dimethyle Sulfoxide), tiyüüre ve potasyum iyodür kullanıldı. Bitki ekstraktlarının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan ·OH radikaline karşı koruyucu etkileri % inhibisyon olarak verildi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı [100].

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

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

S_c = Kontrol DNA'nın supercoiled formunun yüzdesi.

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

2.2.5.1 DNA Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz (1 g) 100 mL Tris asetat tamponuna (40mM tris aseta, 1mM EDTA, pH 8.2) ilave edildi ve kaynamak üzere mikrodalga fırına bırakıldı. Kaynadıktan sonra 60°C'ye soğutuldu. 1.5 µL etüdyum bromür(10mg/mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti, kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel 40–45 dakika donmak üzere oda sıcaklığında bırakıldı.

2.2.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması

Bitki ekstraktından 0.005 gr alındı, üzerine 1 ml saf su ilave edildi, vortekslenip süzüldü. 100-500mg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu deneyde 10 tane ependof tüpü alınarak alınan tüplerin hepsine sırayla 4 mikrolitre Trisasetat tampon çözeltisi, 3

mikrolitre DNA, 2 mikrolitre bitki ekstraktı çözeltisi, 1 mikrolitre H₂O₂ bırakıldıktan sonra tüm tüplere sırasıyla;

1.tüpe DNA, 2.tüpe DNA + H₂O₂ + Ultraviyole Işın, 3.tüpe DNA + Ultraviyole Işın , 4.tüpe DNA + H₂O₂ , 5.tüpe DNA + 200mg/ml bitki ekstraktı + Ultraviyole Işın , 6.tüpe DNA + 100mg/ml bitki ekstraktı + H₂O₂ + Ultraviyole Işın , 7.tüpe DNA + 200mg/ml bitki ekstraktı + H₂O₂ + Ultraviyole Işın , 8.tüpe DNA + 300mg/ml bitki ekstraktı + H₂O₂ + Ultraviyole Işın , 9.tüpe DNA + 400mg/ml bitki ekstraktı + H₂O₂ + Ultraviyole Işın , 10.tüpe DNA + 500mg/ml bitki ekstraktı + H₂O₂ + Ultraviyole Işın ilave edildikten sonra hazırlanan bu DNA karışımları, kullanıma hazır hale gelen ve otoklav bandı açılarak tarağı çıkarılan jeldeki kuyucuklara uygun bir pipetle 3 mikrolitre yükleme tamponu + 3 mikrolitre DNA karışımları aktararak, hazırlanan Jel 200 mL Tris asetat tamponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 40 V'ta 500mA akım uygulanarak 180 dakika süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildi, tel bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı çekildi.

2.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS for Windows 12.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Anlamlılık derecesi, $p < 0.05$ kabul edildi.

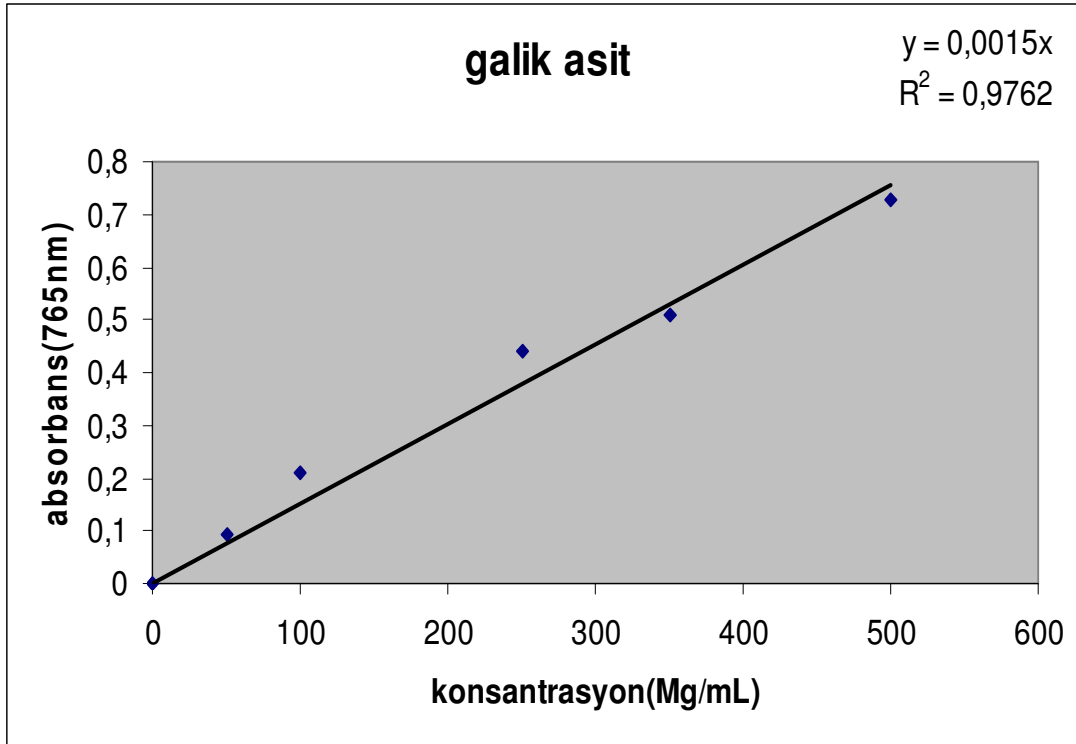
3. BULGULAR

3.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Bitkinin metanol ekstraktının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Standart olarak kullanılan gallik asitin 50, 100, 250, 350, 500µg/mL konsantrasyon aralığına karşılık gelen çözeltileri hazırlanarak, 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.1.). Aşağıdaki denklem elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0015 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktının 1 mg'ının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* bitkisinin metanol ekstraktının 1 mg'ının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı $179 \pm 13 \mu\text{g}$ gallik asite eşdeğer olduğu bulundu.



Şekil 3.1. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Benth) Bornm'ın metanol ekstraktının gallik asitin artan derişimlerine karşılık ölçülen absorbans değerleri

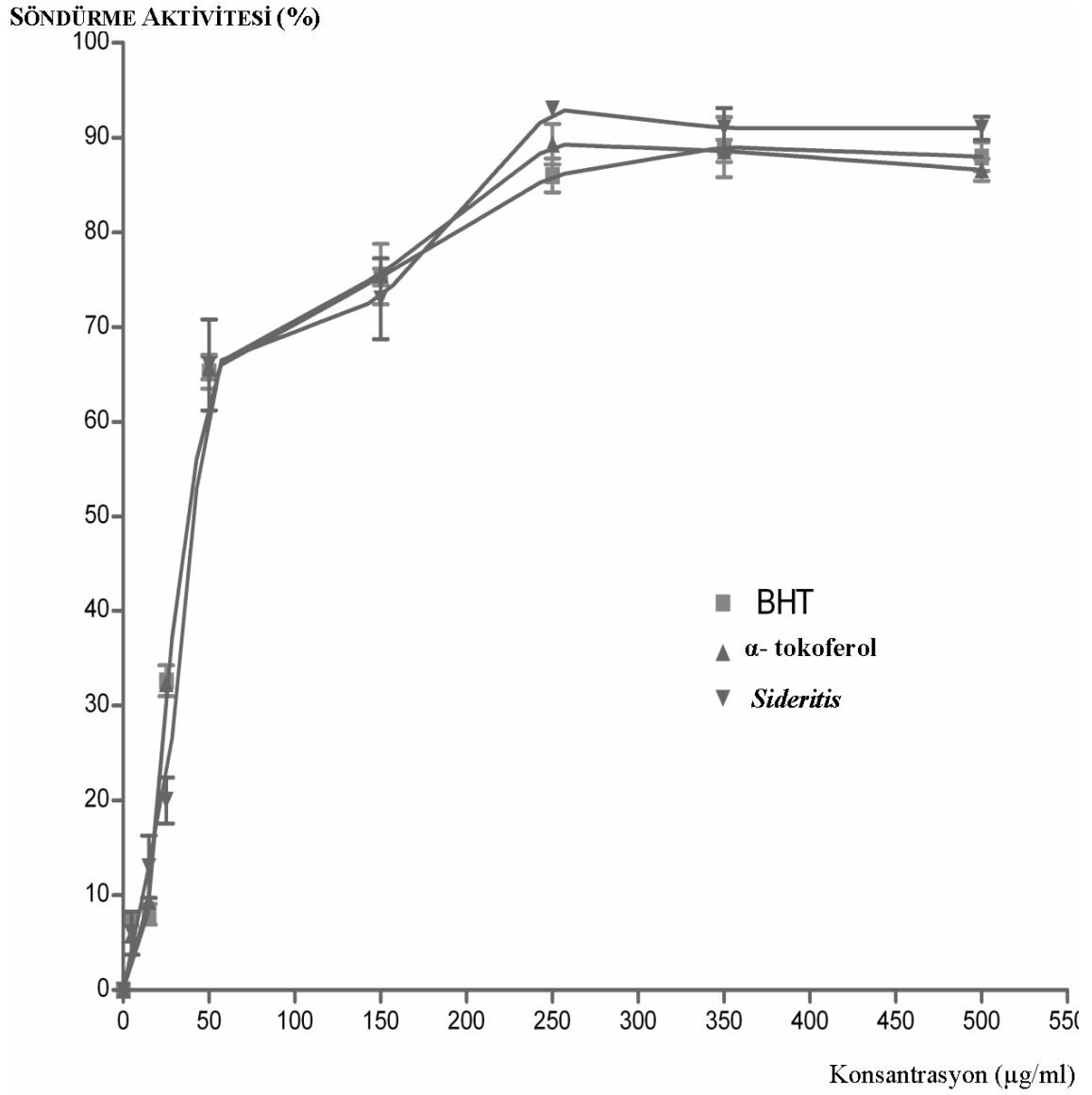
3.2. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Bitki ekstraktının DPPH (2,2 difenil–1-pikrilhidrazil) radikalini söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı (Tablo 3.2.).

Tablo3.2. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Benth) Bornm'in metanol ekstraktı ile hazırlanan, pozitif kontrol olarak BHT ve α -tokoferol'ün kullanıldığı DPPH radikalini söndürme aktivite-
lerinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart
sapmalar hesaplanarak verilmiştir (n=3).

Çalışılan Konsantrasyon Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	BHT	α - Tokoferol	<i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>linearis</i> (Benth) Bornm
5	7.5 $\pm$ 0.70	5.8 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 3.9
15	8.0 $\pm$ 1.90	9.4 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 5.7
25	32.6 $\pm$ 2.80	32.3 $\pm$ 0.5	20.0 $\pm$ 4.2
50	65.3 $\pm$ 3.10	65.7 $\pm$ 2.1	66.0 $\pm$ 8.3
150	75.3 $\pm$ 1.52	75.6 $\pm$ 5.5	73.0 $\pm$ 7.4
250	86.0 $\pm$ 3.10	89.3 $\pm$ 3.7	93.0 $\pm$ 1.2
350	89.0 $\pm$ 5.50	88.6 $\pm$ 2.0	91.0 $\pm$ 3.7
500	88.0 $\pm$ 2.60	86.6 $\pm$ 2.0	91.0 $\pm$ 2.1

DPPH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken pozitif kontrol olarak α -tokoferol ve BHT kullanıldı. 5, 15, 25, 50, 150, 250, 350, 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *Sideritis* bitkisinin metanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesi sırasıyla %6.0 $\pm$ 3.9, %13.0 $\pm$ 5.7, %20.0 $\pm$ 4.2, %66.0 $\pm$ 8.3, %73.0 $\pm$ 7.4, %93.0 $\pm$ 1.2, %91.0 $\pm$ 3.7, %91.0 $\pm$ 2.1 arasında, pozitif kontrol olarak kullanılan α -tokoferol için %5.8 $\pm$ 0.8, %9.4 $\pm$ 0.6, %32.3 $\pm$ 0.5, %65.7 $\pm$ 2.1, %75.6 $\pm$ 5.5, %89.3 $\pm$ 3.7, %88.6 $\pm$ 2.0, %86.6 $\pm$ 2.0 arasında ve BHT için %7.5 $\pm$ 0.70, %8.0 $\pm$ 1.90, %32.6 $\pm$ 2.80, %65.3 $\pm$ 3.10, %75.3 $\pm$ 1.52, %86.0 $\pm$ 3.10, %89.0 $\pm$ 5.50, % 88.0 $\pm$ 2.60 bulundu (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *Linearis* (Bentham) Bornm.'in metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini söndürme aktivitesinin spektrometrik analiz verileri için pozitif kontrol olarak α-tokoferol ve BHT kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p<0.05)

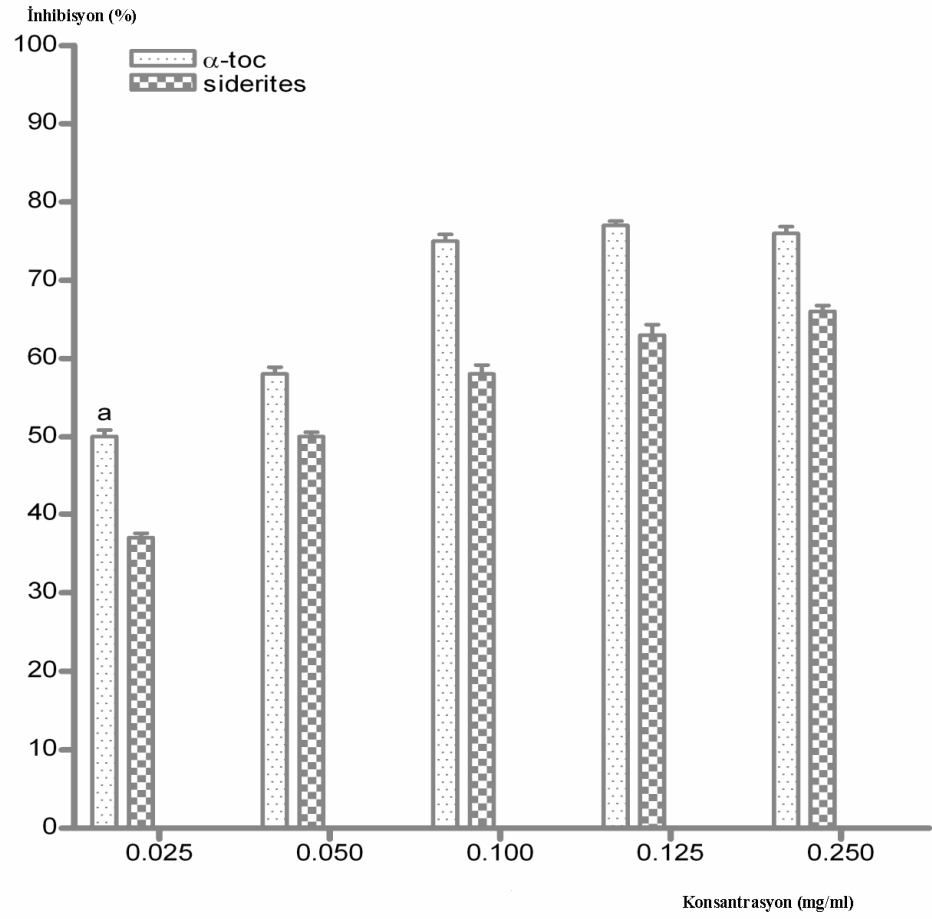
3.3. Lipid Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Bitki ekstraktının in vivo Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı (Tablo 3.3.).

Tablo 4.3. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Benth) Bornm'in metanol ekstraktının farklı hazırlanan ve pozitif kontrol olarak α -tokoferol'ün kullanıldığı lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve $\pm$ standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir (n=3).

Çalışılan Konsantrasyon Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	α -Tokoferol	<i>Sideritis libanotica</i> Labill. ssp. <i>linearis</i> (Benth) Bornm
0.025	50.0 $\pm$ 1.5	37.0 $\pm$ 1.0
0.050	58.0 $\pm$ 1.5	50.0 $\pm$ 1.0
0.100	75.0 $\pm$ 1.5	58.0 $\pm$ 2.0
0.125	77.0 $\pm$ 1.0	63.0 $\pm$ 2.3
0.250	76.0 $\pm$ 1.5	66.0 $\pm$ 1.3

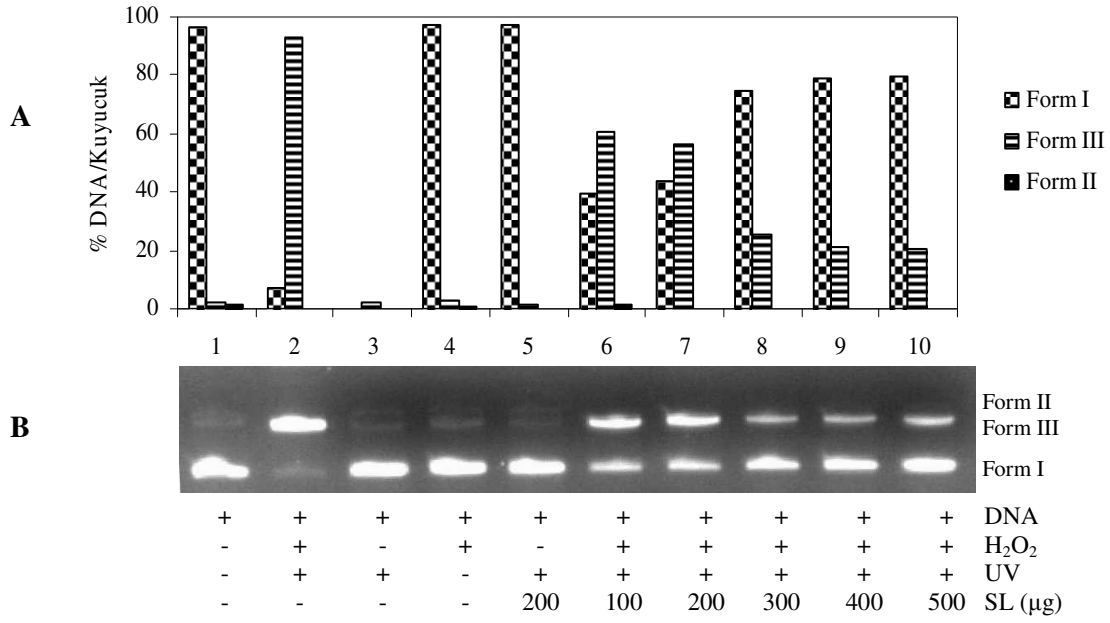
Bitki ekstraktının Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi sıçan beyni homejanatı üzerinde in vitro olarak araştırıldı. Pozitif kontrol olarak α -tokoferol kullanıldı. *Sideritis libanotica* bitkisinin metanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelenirken 0.025, 0.050, 0.100, 0.125, 0.250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *Sideritis* bitkisinin metanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi sırasıyla % 37.0 $\pm$ 1.0, % 50.0 $\pm$ 1.0, % 58.0 $\pm$ 2.0, % 63.0 $\pm$ 2.3, % 66.0 $\pm$ 1.3, arasında ve α -tokoferol'ün %50.0 $\pm$ 1.5, %58.0 $\pm$ 1.5, %75.0 $\pm$ 1.5, %77.0 $\pm$ 1.0, %76.0 $\pm$ 1.5 arasında bulundu (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *Linearis* (Bentham) Bornm.'in metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin spektrometrik analiz için pozitif kontrol olarak α -tokoferol kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve $\pm$ standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p<0.05$)

3.4. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA kesiminin incelemenin bir yolu supercoiled DNA'nın (süper kıvrımlı çembersel DNA, kırık yok, Form I), Open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA, DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) veya lineer (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık; Form III) forma dönüşümünü incelemektir. Agaroz jel Elektroforezinde Bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II' nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir. Çalışmada kullanılan pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2kb) Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı⁸⁶. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın H₂O₂'nin UV fotolizi sonucu oluşturulan ·OH radikalleri ile etkileşmesi Agaroz Jel Elektroforezi ile test edildi. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis*'in metanol ekstraktının 100–500 µg/mL konsatrasyon aralığında DNA'yı ·OH radikaline karşı koruma etkisi araştırıldı. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis*'in metanol ekstraktlarının plazmid DNA'yı hidroksi radikallerinin neden olduğu kesimine karşı 100–500 µg/mL konsatrasyon aralığında % 36.59–81.30 oranında, konsantrasyona bağlı olarak önlediği tespit edildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Kuyucuklardaki pbluescript M13+ plazmid DNA'sının form I, form II ve form III yüzdeleri (A). *Sideritis libanotica* Labill ssp. *linearis* (SL) bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan 'OH'ne karşı koruyucu etkilerinin agaroz jel elektroforezi (B)

1. kuyucuk: DNA; 2. kuyucuk: DNA + H₂O₂ + Ultraviyole Işın; 3. kuyucuk: DNA + Ultraviyole Işın ; 4. kuyucuk: DNA + H₂O₂; 5. kuyucuk: DNA + SL(200 μg/mL) + Ultraviyole Işın ; 6. kuyucuk: DNA + SL(100 μg/mL)+ H₂O₂ + Ultraviyole Işın; 7. kuyucuk: DNA + SL(200 μg/mL)+ H₂O₂ + Ultraviyole Işın; 8. kuyucuk: DNA + SL(300 μg/mL) + H₂O₂ + Ultraviyole Işın; 9.kuyucuk: DNA + SL(400 μg/mL)+ H₂O₂ + Ultraviyole Işın; 10. kuyucuk: DNA + SL(500 μg/mL)+ H₂O₂ + Ultraviyole Işın.

4. TARTIşMA VE SONUÇ

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir.

Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, serbest radikallerin vücutta fazlaştığı görülür. Bu da vücutta kalp hastalıkları, hipertansiyon, yaşlanma, kanser, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklara neden olur. Tıp bir yandan hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler araştırırken bir yandan da sağlıklı bir yaşam sürdürme ve hastalıkları önleme alanında yoğun çalışmalar yapmaktadır. Bu bağlamda, serbest radikal oluşumunun ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi söz konusu hastalıklara yakalanma riskini azaltmak üzere antioksidan diyet uygulanması ve/veya ilaç kullanımı açısından önemli olmaktadır. Ayrıca, pekçok araştırmacı uzun süredir besin proseslemede kullanılan BHA ve BHT gibi bazı sentetik antioksidanların canlı organizmalarda karsinojenik etki gösterdiğine dikkat çekmektedirler. Tüketiciler de genellikle doğal antioksidanları sentetik olanlara tercih etmektedir.

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli özellikleri, uzun yıllardan beri araştırılmaktadır. Bitkilerdeki fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, İç Anadolu bölgelerinde yetişen halk arasında “Dağ çayı, Yayla çayı” olarak adlandırılan ve yaygın bir şekilde kullanılan bitkilerin başında gelen *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* bitkisinin metanol ekstraktının antioksidan ve DNA'yı serbest radikallerden koruma etkilerini araştırdı..

Fenolik bileşenler radikal söndürücü özellikleri olan çok önemli bitki bileşenleridir. Bu bileşenler antioksidan aktiviteden sorumludurlar. Toplam fenolik bileşen miktar

taininde amaç bitkinin içerdği gallik asite ekvalent fenolik bileşen miktarını bulmaktır. Genellikle güçlü radikal söndürme ve antioksidant aktivitesi olan maddelerin yüksek oranda fenolik bileşen içerdikleri bulunmuştur. Bu nedenle bu yöntem bitkilerin içerdği toplam fenolik bileşen miktarını ölçme temeline dayanmaktadır [101].

Sideritis bitkisinin metanol ekstratının 1mg'nın içerdği toplam fenolik bileşen miktarı $179.4 \pm 13 \mu\text{g}$ gallik asite eşdeğer olarak bulundu. *Sideritis* bitkisinin metanol ekstratında bulunan toplam fenolik bileşen miktarının yüksek olması, bu bitkinin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Tunalier ve Arkadaşları tarafından yapılan 10 siderites türlerinin fenolik bileşenleri ise 333.5 ± 0.9 ve 165.9 ± 2.5 arasında bulunmuştur¹. Araştırmamızda toplam fenolik bileşen içeriğine yönelik elde ettiğimiz sonuçlar Tunalier ve arkadaşları tarafından bulunan sonuçlarla uyum içerisindedir.

DPPH radikalini söndürme yöntemi, antioksidant aktivite ölçme çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır [102]. Bu yöntem serbest kararlı bir radikal olan DPPH'in indirgenmesi temeline dayanmaktadır. DPPH'in ortaklanmamış elektronu 517 nm de güçlü bir absorpsiyon vermektedir. Elektron veren bir antioksidantın varlığında bu absorpsiyon azalmaktadır [103]. DPPH'in mor rengi antioksidant madde ilavesiyle gözle görünür şekilde sarıya dönüşmektedir [104].

Liu ve Arkadaşları, *Ginkgo biloba* endofilik *Xyloria* sp. XY-28 meyvesinin metanol ekstratının DPPH radikalini söndürme aktivitesine bakmışlardır. BHT ve askorbik asit (Asc A) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 400 $\mu\text{g/mL}$ derişimde sırayla; Asc A ($\%90.16 \pm 0.059$), metanol ekstraktı ($\%82.42 \pm 0.04$), BHT ($\% 60.24 \pm 0.05$) inhibisyon değerlerini elde etmişlerdir [105].

Yeşilyurt ve arkadaşları, *Salvia cedronelle* Boiss bitkisinin toprak üstündeki kısımlarının DPPH radikal söndürme aktivitesine (%) inhibisyon olarak bakmışlardır. BHT ve α - tokoferol pozitif kontrol olarak kullanılmış. 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde elde edilen inhibisyon değerleri ekstrakt ($\%95.39 \pm 0.10$), α - tokoferol ($\%94.79 \pm 0.50$), BHT ($\%94.79 \pm 0.28$) olarak tespit edilmiştir [106].

Bizim çalışmamızda da DPPH Radikalini söndürme aktivitesinin ölçülmesi için pozitif kontrol olarak antioksidan aktivite gösterdiği bilinen BHT ve α - tokoferol kullanıldı. BHT , α - tokoferol ve *Siderites* bitkisinin inhibisyon gücü 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de sırasıyla $\% 65.3 \pm 3.10$, $\%65.7 \pm 2.1$ ve $\% 66.0 \pm 8.3$ ulaştığı ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'de ise BHT , α - tokoferol ve *Sideritis* bitkisinin inhibisyon gücünün sırasıyla, $\% 88.0 \pm 2.6$, $\% 86.6 \pm 2.0$ ve $\%91.0 \pm 2.1$ olarak

arttığı gözlenmiştir. Bitki ekstraktında maksimum aktivite 250 µg/mL de gözlemlendi. Bu konsantrasyonda bitki, BHT ve α- tokoferol'ün DPPH radikalini söndürme aktivitesi sırasıyla % 93.0 ± 1.2, 86.0 ± 3.10 ve 89.3 ± 3.7 bulundu. Bu amaca yönelik elde ettiğimiz sonuçlar, Liu ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlardan daha iyi, Yeşilyurt ve Arkadaşlarının buldukları sonuçlarla yaklaşık aynı bulunmuş olup, bulunan bu sonuçlar bize bitki ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesine sahip olduğunu ve bu ekstraktın içinde bulunan maddelerin serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürdüğünü göstermektedir.

Ham maddelerin işlenmesi ile ürünün saklanması sırasında oluşan lipit oksidasyonu besinlerin acılaşmasına neden olan ve böylelikle bozulmaya yol açan bir süreçtir. Lipit oksidasyon ürünleri besinlerin içerisinde bulunan protein gibi diğer maddelerin de absorpsiyonunu etkileyebilir [107]. Okside olmuş lipitlerin organizma üzerine istenmeyen etkileri nedeniyle besinlerdeki lipit oksidasyon ürünlerini inhibe etmenin önemi daha da artmaktadır. Endüstriyel proseslerde besinlerin saklama süresini uzatmak için esas olarak sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır [108]. Lipid oksidasyonu, besinlerin kalitesini kaybetmesinin diğer bir deyişle renk, koku, tat, görünüş ve besin değeri gibi önemli özelliklerinin kaybolmasının nedenidir. Antioksidanlar ise yağların oksidatif bozulmalarını önleyerek besinlerin kalitesini koruyan maddelerdir [109]. Gıda endüstrisinde oksidatif bozunmadan korumak için rutin olarak BHA (Butillenmiş hidroksianizol), BHT (Butillenmiş hidroksitoluol) PG (propilgallat) ve TBHQ (Tersiyer-butilhidrokinon) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Bu antioksidanlar oldukça etkin, stabil ve ucuz olmalarına karşın, potansiyel yan etkileri konusunda kuşkular vardır. Bu nedenle tüketici tercihleri, endüstriyi doğal antioksidan kaynakları aramaya yöneltmiştir [110]. Doğal antioksidanlar; flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddelerdir [111].

Bitki ekstraktının Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi çalışmasında sıçan beyni homejanatı üzerinde in vitro olarak araştırıldı. Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelenirken 0.025, 0.050, 0.100, 0.125, 0.250 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis*'in methanol ekstraktının ve pozitif kontrol olarak kullanılan α-tokoferolün Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi sırasıyla 0.025 µg/mL' de % 37.0 ± 1.0 ve % 50.0 ± 1.5'e ulaştığı, 0.250 µg/mL'de % 66.0 ± 1.3 ve %76.0 ± 1.5'e ulaştığı gözlenmiştir. Bitki ekstraktında maksimum aktivite 0.250

$\mu\text{g/ml}$ de gözlemlendi. Bu sonuçlar bize bitki ekstraktının Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine sahip olduğunu ve bu ekstraktın içinde bulunan maddelerin serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürdüğünü göstermektedir.

Emen ve arkadaşları, *C.niveum* bitkisinin n-bütanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesini % 89.9 olarak bulmuşlardır [112].

Kızıl ve arkadaşlarının Lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin önlenmesi çalışmasında, *Hypericum triquetrifolium* ve *Hypericum scabroides* bitkilerinin ethanol ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [113]. *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis*'in methanol ekstraktının (100–500 $\mu\text{g/mL}$) H_2O_2 'nin Ultraviyole Işın fotolizi sonucu oluşturulan 'OH radikallerinin, DNA'da meydana getirdiği hasarı koruma etkisi pBluescript M13+ plazmid DNA üzerinde Agaroze Jel Elektrophorezi ile test edildi (Şekil.3.4).

H_2O_2 fotolizi sonucu ekstraktlar varlığında ve yokluğunda DNA'nın elektroforetik alanda yürüyüşünü göstermektedir. pBluescript M13+ plazmid DNA agaroz jelde 3 bant gösterdi (Kuyucuk 1). Hızlı yürüyen bant supercoiled DNA, yavaş yürüyen bant liner DNA, ikisinin ortasındaki bant ise open circular DNA'dır. DNA H_2O_2 varlığında UV ile etkileştirildiğinde (Kuyucuk 2) supercoiled DNA, opencircular DNA ve liner DNA'ya dönüştü. *Sideritis libanotica* Labill ssp. bitkisinin metanol ekstraktının (200 μg) tek başına (Kuyucuk 5) DNA üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemlendi. Reaksiyon karışımına ekstrakt eklendiğinde (kuyucuk 6–10) H_2O_2 'nin UV fotolizi sonucu oluşturulan OH radikallerine maruz kalmış plazmid DNA'da opencircular (Form II) ve liner DNA (FormIII) oluşumunu 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda sırasıyla %36.59, 41.17, 75.40, 79.92 ve 81.30 oranında engellendiği gösterilmektedir.

Benzer bir çalışma, *Hypericum triquetrifolium* ve *Hypericum scabroides* bitkilerinin ethanol ekstraktlarıyla yapılmıştır. Bu ekstraktların plazmid DNA'yı hidroksi radikallerinin neden olduğu kesimine karşı koruduğu gözlemlenmiştir [114]. Yine başka benzer bir çalışmada ise *C. niveum* bitkisinin metanol, etil asetat ve n-bütanol ekstraktlarının DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisi incelenmiştir. *C. niveum* ekstraktlarının 'OH radikalleri sonucu oluşan DNA kesimini engellediği gözlemlenmiştir. Bitki ekstraktlarının pozitif kontrollerden daha güçlü, hidroksi radikallerini söndürme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir [112].

Sonuç olarak bu çalışmada, *Sideritis* bitkisinin antioksidan özelliği araştırıldı. Toplam fenolik bileşen miktar tayini, DPPH radikalini söndürme, lipid peroksidasyonunu önleme ve DNA yı serbest radikallerden koruma etkileri incelendi. *Sideritis* bitkisinin metanol ekstraktının in vitro lipit peroksidasyonunu önlediği ve aynı zamanda plazmid DNA'yı hidroksi radikallerinin neden olduğu kesimine karşı koruduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar *Sideritis* bitkisinin antioksidan aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] **Tunalier, Z. Öztürk, N. Koşar, M.K. Başer, K.H.C. Duman, H. Kırimer, N.,** Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29–31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- [2] **Kırimer, N. Tabanca, N. Tümen, G. Duman, H. Başer, K.H.C.,** 1999. Composition Of Essential Oils Four Endemic *Sideritis* Species from Turkey. *Flavour and Fragrance J.*, 14, 421-425.
- [3] **Krimer, N. Baser, K.H.C, Demirci, B. Duman, H.,** 2004. Essential Oils of *Sideritis* Species of Turkey Belonging to Section Empedoclia, *Khim. Prir. Soedin. Chemistry of Natural Compounds*, 40(5):19–23.
- [4] **Nakiboğlu, L.,** 2007. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey, *Food Chemistry*, 104(2):630–635.
- [5] **Chalcat, J.C. Özcan, M.,** 2005. Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit: some physical and chemical properties. *Journal of Food Engineering*, 31(1–2): 65–70.
- [6] **Yeşilyurt, V. Halfon, B. Öztürk, M. Topçu, G.,** 2008. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. *Food Chemistry*, 108:31-39.
- [7] **Tepe, B. Sokmen, M. Akpulat, H.A. Yumrutas, O. Sokmen, A.,** 2006. Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill subsp. *linearis* (Benth) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chemistry*, 98 9–13.
- [8] **Tepe, B. Sökmen, M. Sökmen, A. Daferera, D. Polissiou, M.,** 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *Sipyleus* and *sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *Rosulans* *Journal of Food Engineering*, 69:335-3342.
- [9] **Liu, X. Dong, M. Chen, X. Jiang, M. Lv, X. Yan, G.,** 2007. GC Content Variability Of Eubacterial Genomes Is Governed by the Alpha Subunit of DNA Polymerase III. *Food Chemistry*, 105, 548-554.
- [10] **Chua, M.T. Tung, Y.Y. Chang, S.T.,** 2008. *Bioresource Technology*, 99, 1918-1925.
- [11] **Topçu, G. Ay, M. Bilici, A. Sarıkürkçü, C. Öztürk, M. Ulubelen, A.,** 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103, 816-822.
- [12] **Belitz, H.D. Grosch, W.,** 2005. *Food Chemistry*, Springer Verlag (Berlin Heidelberg New York Paris).
- [13] **Başer, K.H.C. Kırimer, N.,** 1998. Bazı Yeni Bitki Türleri ve Türkiye Florası için Yeni Kayıtlar. *TAB Bülteni*, 57: 13.
- [14] **Aydın, S. Öztürk, Y. Beis, R. & Başer, K.H.C.,** 1986. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy Research*, 10: 342.
- [15] **Sezik, E. Ezer, N.,** 1983. Türkiye’de Halk İlacı ve Çay Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar, I. *Sideritis congesta* Davis et Hub.-Mor., *Doğa Bilim Dergisi Tıp*, 7, 163–168,
- [16] **Dawn, B.M. Allan, D.M. Colleen, M.S.,** 1996. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach, Lippicott Williams & Wilkins, *Baltimore, Maryland*. Peg.806
- [17] **Spittle, C.R.,** 1974. The action of vitamin C on blood vessels. *American Heart Journal*, 88;387.

- [18] **Anderson, R. Oosthuizen, R. Maritz, R. Theron, A. Rensberg, A.J.,** 1980. The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and Humoral immune functions in normal volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33: 71.
- [19] **Lewin, S.,** 1974. Evaluation of Potential Effects of High Intake of Ascorbic Acid. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47:681.
- [20] **Cameron, E. Pauling, L.,** 1976. Supplemental ascorbate in the supportive treatment Of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 73:3685-3689.
- [21] **Cameron, E.,** 1982. Vitamin C and Cancer, An Overview International Journal of Vitamin and Nutrition Research Suppl, 23, 1982, p. 115-127.
- [22] **Fritsma, G.A. George, A. Fritsma, M.S.,** 1983. Vitamin E and autoxidation. *American Journal of Medical Technology*, 49:6,453–456.
- [23] **Mascio, P. Murphy, M.E. Sies, H.,** 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53 (1 Suppl):194–200.
- [24] **Tekman, Ş. Öner, N.,** 1981. *Genel Biokimya*. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. No:30 İSTANBUL.
- [25] **Harborne, J.B. and Baxter, H.,** 1999. The handbook of natural flavonoids. *The handbook of natural flavonoids*, 2 volumes, WileyVCH, Weinheim.
- [26] **Tanaka, Y.,** 2006. Flower colours and cytochromes. *Phytochemical review*, 5: 283–291.
- [27] **Fahrrnan, B. Volkova, N.,** 2002. *Nutrition*, 18: 268.
- [28] **Cardenas, M. Marder, M. Blank, V.C. Roguin, L.P.,** 2006. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14: 2966.
- [29] **Trovato, A. Monforte, M.T.,** 2000. In vitro anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids. *Bollettino chimico farmaceutico*, 139 (5): 225-227
- [30] **Quilez, J. Garcia-Lorda, P. Salas-Salvado, J.,** 2003. Potential uses and benefits Of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin Nutr*, 22:343-351.
- [31] **Jong, A. Plat, J. Mensink, R.P.,** 2003. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J Nutr Biochem*, 14:362-369.
- [33] **Williams, L.T.,** 1989. Signal transduction by the platelet – derived growth factor receptor. *Science*, 243:1564-70.
- [33] **Ostlund, R.E.,** 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*, 22:533-549.
- [34] **Piironen, V. Toivo, J. Lampi, A.M.,** 2000. Natural sources of dietary plant sterols. *J Food Comp Anal*, 13:619-624.
- [35] **Frank, J.,** 2004. Dietary phenolic compounds and vitamin e bioavailability : model studies in rats and humans. *Acta Universitatis Agriculturae Suecia, Agraria*, 446, ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-6453-6
- [36] **Balasundram, N. Sundram, K. Samman, S.,** 2005. Phenolic compounds in plants And agri - industrial by - products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry, article in pres*, 99:191-203.
- [37] **Casley - Smith, J.R.,** 1997. Coumarin in the Treatment of Lymphoedema and Other High-Protein Oedemas. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. (Eds: O’Kennedy R, Thorne RD), Chichester, John Wiley & Sons, pp 143-184.

- [38] **Harman, D.**, 1956. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11,298-300.
- [39] **Ames, B.N. Shigenaga, M.K. Hagen, T.M.**, 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of National Academy Science*, 90: 7915-7922.
- [40] **Poontariga, H. Darinee, P. Kannarat, R. Charoensataporn, R.**, 2003. *Science Asia*, 29: 109.
- [41] **Gökpınar, Ş. Koray, T. Akçiçek, E. Göksan, T. Durmaz, Y.**, 2006. Algal Antioksidanlar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23: 85-89.
- [42] **Çavdar, C. Sifil, A. Çamsarı, T.**, 1997. Albumin düzeyleri ile yaşam süresi arasındaki ilişki. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4:120-125.
- [43] **Gülçin, İ.**, 2006. Antioxidant and antiradical activities of L - Carnitine. *Life Sciences*, 78:803-811.
- [44] **Halliwell, B.**, 1995. How to characterize an antioxidant : An update. *Biochemistry Society Symposium*, 61:73-101.
- [45] **Squadriato, G.L. Peyor, W.A.**, 1998. Oxidative chemistry of nitric oxide: the role Of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25:392-403.
- [46] **Buechter, D.D.**, 1988. Free Radicals and Oxygen Toxicity. *Pharmacological Research*, 5:253-260.
- [47] **Machlin, L.J. Bendich, A.**, 1987. Free radical tissue damage : protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1(6):441-5.
- [48] **Mills, E.M. Takeda, K. Yu, Z.X.**, 1998. *Biol Chem.*, 273: 22165-8.
- [49] **Hurst, R. Bao, Y. Jemth, P. Mannervi, B. Williamson, G.**, 1997. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. *Biochem. Soc. Trans.*, 25, S559.
- [50] **Mehdy, M.C.**, 1994. Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant Physiol.*, 105-467
- [51] **Lamb, C. Dixon, R.A.**, 1997. The oxidative burst in plant disease resistance *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 48:251-75
- [52] **Cakir, A. Duru, M.E. Harmandar, M. Ciriminna, R. Passannanti, S. Piozzi, F.**, 1997. *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 285-287.
- [53] **Gülçin, İ. Büyükkokuroğlu, M.E. Oktay, M. Küfrevioğlu, Ö.İ.**, 2003. Antioxidant And AnAlgesic Activities of Turpentine of *Pinus Nigra* Arn. Subsp. *Pallasiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1):51-58.
- [54] **Block, G. Peterson, B. Subar, A.**, 1992. Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiological Evidence. *Nutrition and Cancer* 18, 1-29.
- [55] **Brown, M.S. Goldstein, J.L.**, 1986. A receptor – mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232: 34-47.
- [56] **Harman, D.**, 1995. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. Univ. Calif. Rad. Lab. Report No:3078.
- [57] **Murray, R.K. Granner, D.K. Mayes, R.A. Rodwell, V.W.**, 1996. *Fizyolojik öneme sahip lipidler*. Dikmen, N. Özgünen, T. Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- [58] **Akkuş, İ.**, 1995. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya.

- [59] **Gutteridge, J.M.**, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. 41: 1819–28.
- [60] **Rice - Evans, C.A. Diplock, A.T. Symons, M.C.R.**, 1991 . Techniques in free radicals research. vol, 22 *Elsevier*, Amsterdam.
- [61] **Albert, K.J.**, 1995. *Journal of Chromatography A*, 703:123–147
- [62] **Yanbeyi, S.**, 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 88s (yayınlanmamış),Samsun.
- [63] **Maxwell, S.R.**, 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. Mar; 49(3):345-61.
- [64] **Holley, A.E. Cheeseman, K.H.**, 1993. Measuring free radical reactions in vivo. *British medical bulletin*. 49(3):494–505.
- [65] **Fırat, S.**, 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, Glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu Sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.D., Uzm. Tezi, 95s (yayınlanmamış). Ankara.
- [66] **Frei, B.**, 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins : Mechanisms of Action. *The American Journal of Medicine*, 97(Suppl 3A),26,3A-5S-3A-12S.
- [67] **Hallwell, B. Gutteridge, J.M.**, 1984. Lipid peroxidation , oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1(8391):1396-7.
- [68] **Oğuz, M.**, 1990. Oksijen radikalleri. C.Ü.Tıp Fak. Der., 12,2.
- [69] **Winrow, V.R. Winyard, P.G. Morris, C.J. Blake, D.R.**, 1993. Free radicals İn Inflammation. Second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*, 49(3):506–522.
- [70] **Harman, D.**, 1955. Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry. Univ. Calif. Rad. Lab. Report No. 3078, July 14, 1955.
- [71] **Lagerlof, H. Nilsson, C.G.**, 1989. The biology of ageing arteries. An intergrated view. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 43: 505–12.
- [72] **Krzanowski, J.J.**, 1991. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Journal of the Florida Medical Association* 78: 435–8.
- [73] **Yardumian, D. Mackie, I. Machin, S.**, 1986. Laboratory investigation of platelet function, a reiew of methodology. *J Clin Pathol*,39:701-12.
- [74] **Williams, L.T.**, 1989. Signal transduction by the platelet – derived growth factor receptor. *Science*, 243:1564–70.
- [75] **Seifried, H.E. Anderson, D.E. Sorkin, B.C. Costello, R.B.**, 2004. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *Journal of Nutrition* 134:3143-3163
- [76] **Von Sonntag, C. & Schuchmann, H.P.**, 1990. Sulfur compounds and chemical repair. In Sulfur-centered reactive intermediates in chemistry and biology. *Methods in Enzimology*, 186:511-520.
- [77] **Grollman, A.P. Moriya, M.**, 1993. Mutagenesis by 8-oxoguanine : an enemy within. *Trends in Genetics*, 9:246-249.
- [78] **Bos, J.**, 1988. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research*, 195:255-271.
- [79] **Punnonen, K. Ahotupa, M. Asaishi, K. Hyoty, M. Kudo, R. Punnonen, R.**, 1994. *Research & Clinical Oncology*, 120:374-377.

- [80] **Ames, B.N. Shigenaga, M.K. Hagen, T.M.,** 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science*, 90(17):7915–22
- [81] **McCord, J.M.,** 1985. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *Clinical Biochemistry*, 26: 351–357.
- [82] **Brownlee, N.R. Huttner, J.J. Panganamala, R.V. Cornwell, D.G.,** 1977. Role of Vitamin E in Glutathione – induced Oxidant Stress : Methemoglobin, lipid peroxidation and hemolysis. *Journal of Lipid Research*. 18: 635–44.
- [83] **Uysal, M.,** 1998. Serbest radikaller ; lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11: 336–341.
- [84] **Bast, A. Haenen, G.R.M.M. Cees, J.A.D.,** 1997. Oxidants and Antioxidants: State of The Art. *The American Journal of Medicine*, 91,(Suppl 3C),30,3C-2S_3C-13S.
- [85] **Tudhope, G.R.,** 1967. Red Cell Catalase in Health and in Disease , with Reference to The Enzyme Activity in Anaemia. *Clin. Sci*, 33: 165–182.
- [86] **Jones, D.P. Eklow, L. Thor, H. Orrenius, S.,** 1981. Metabolism of Hydrogen Peroxide in Isolated Hepatocytes : Relative Contributions of Catalase and Glutathione Peroxide in Isolated Hepatocytes : Relative Contributions of Catalase and Glutathione Peroxidase in Decomposition of Endogenously Generated H_2O_2 . *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Sep; 210(2):505–16.
- [87] **Fridovich, I.,** 1975. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44: 147– 59.
- [88] **Paglia, D.E. Valentine, W.N.,** 1967. Studies on The Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1):158–69.
- [89] **Mungan, G.,** 1996. Kan bankalarında CPDA–1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine) İle saklanan kanlarda allopürinölün lipid peroksidasyonu ve biyokimyasal parametrelere etkisinin incelenmesi. Ankara Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya. Uzm. Tezi, 67s (yayınlanmamış) Ankara.
- [90] **Flohe, L.,** 1988. Glutathione Peroxidase. *Basic Life Science*, 49: 663–8.
- [91] **Neches, T.F. Boles, T.A. Allen, D.M.,** 1968. Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *The Journal of Pediatrics*, 72,3, 319– 324.
- [92] **Gonzales, R. Auclair, C. Gautero, H. Dhermy D, Boivin, P.,** 1984. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res.* 44(9):4137–4139 (1984).
- [93] **Aksoy, N. Vural, H. Sabuncu, T. Arslan, O. Aksoy, Ş.,** 2005. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. *Nutrition Research*, 25: 625–630.
- [94] **Silinkard, K. Singleton, V.L.,** 1997. Total phenol analyses : Automation And comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28:49–55.
- [95] **Singleton, V.L. Orthofer, R. Lamuela - Raventos, R.M.,** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152–78.
- [96] **Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, K. Nakamura, T.,** 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945–948 (1992).

- [97] **Dorman, H.J.D. Hiltunen, R.,** 2004. Fe (III) reductive and free Radical - Scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*, 88: 193–199.
- [98] **Song, J.H. Simons, C. Cao, L. Shin, S.H, Hong, M. & Chung, M.,** 2003. Rapid uptake of oxidized ascorbate induces loss of cellular glutathione and oxidative stress in liver slices. *Experimental and Molecular Medicine*, 35(2), 67-75.
- [99] **Cheng, V.C. Ho, P.L. Yuen, K.Y.,** 2005. Two probable cases of serious drug interaction between clarithromycin and colchicine. *South Med J.* 2005 Aug; 98(8):811-3.
- [100] **Fukuhara, K. Miyata, N.,** 1998. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8: 3187-3192.
- [101] **Hatano, T. Edamatsu, R.,** 1989. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021.
- [102] **Koleva, I. Beek, T.A.V. Linssen, J.P.H. Groot, A.D. Evstatieva, L.N.,** 2002. *Phytochemical Analysis*, 13: 8–17.
- [103] **Russo, A. Acquaviva, R. Campisi, A. Sorrenti, V. Giacomo, C.D. Virgata, G. Barcellona, M.L.,** 2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology* 16: 91–98.
- [104] **Gülçin, İ. Beydemir, Ş. Alici, H.A. Elmastaş, M. Büyükkokuroğlu, M.E.,** 2004. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*. 49: 59,66.
- [105] **Liu, X. Dong, M. Chen, X. Jiang, M. Lv, X. Yan, G.,** 2007. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 105, 548-554
- [106] **Yeşilyurt, V. Halfon, B. Öztürk, M. Topçu, G.,** 2008. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. *Food Chemistry*, 108, 31-39.
- [107] **Gray, J.I.,** 1978. Measurement of lipid peroxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55: 539
- [108] **Bieri, J.G.,** 1984. Sources and consumption of antioxidants in the diet. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12):1917.
- [109] **Shahidi, F. Naczk, M.,** 1995. Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications, p.235, Technomic Publication.
- [110] **Risch, S.J. Ho, C.T.,** 1997. Spices, p.206, American Chemical Society, USA.
- [111] **Harborne, J.B.,** 1994. The Flavonoids Advances in Research, p.638, Chapman & Hall/CRC, USA.
- [112] **Emen, S. Çeken, B. Kızıl, G. Kızıl, M.,** 2009. DNA damage protecting activity and In vitro antioxidant potential of the methanol extract of *Cyclotrichium niveum*. *Pharmaceutical Biology*, 47(3):219–229.
- [113] **Kizil, G. Kizil, M. Yavuz, M. Emen, S. Hakimoglu, F.,** 2008. Antioxidant activities of ethanol extract of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum Scabroides*. *Pharmaceutical Biology*, 46 (4) 231–241 (2008).
- [114] **Kizil, G. Kizil, M. Çeken, B.,** 2009. Protective ability of ethanol extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum Scabroides* against protein oxidation and DNA damage. *Food Science and Biotechnology*, 18 (1) 130-136.

6.ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Murat ŞAHİN
Doğum Yeri : DİYARBAKIR / Dicle
Doğum Tarihi : 01.02.1976
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lise : Diyarbakır Melik Ahmet Lisesi
Lisans : Fırat Üniversitesi Elazığ Sağlık Yüksekokulu
Sağlık Memurluğu Bölümü
Yüksek Lisans : Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

ÇALIŞTIĞI KURUMLAR

- Elazığ İl Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuvarı
- Diyarbakır İl Sağlık Müdürlüğü Eğil Meşeler Sağlık Ocağı