T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYARBAKIR KARPUZU'NUN *İN VİVO* VE *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevcan ALTAŞ

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık 2015

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Sevcan ALTAŞ tarafından yapılan "Diyarbakır Karpuzu'nun *İn Vivo* ve *İn Vitro* Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN

Üye : Prof. Dr. Göksel KIZIL (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Üye : Prof. Dr. Halit DEMİR

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/12/2015

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../.....

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim boyunca deneyimleri ile yol gösteren, yanında çalışmaktan büyük onur duyduğum, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Göksel KIZIL'a çok teşekkür ederim.

Doktora tezim için konu seçimi, materyal temini ve çalışmaların yönlendirilmesinden sonuçlanmasına kadarki süreçte her türlü sorunumla büyük özveriyle ilgilenen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam sayın Prof. Dr. Murat KIZIL'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı, yüksek lisans tez danışmanım ve aynı zamanda doktora yeterlilik sınav jürisi, tez izleme komitesi ve tez savunma jürisinde yer alan sayın hocam Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Doktora yeterlilik sınav jürisi, tez izleme komitesi ve tez savunma jürisinde yer alan sayın Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'e teşekkür ederim.

Doktora yeterlilik sınav jürisi ve tez savunma jürisinde bulunan sayın Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez savunma jürisinde bulunan sayın Prof. Dr. Halit DEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bir kısmını De Montfort Üniversitesi Sağlık ve Yaşam Bilimleri Fakültesinde yapabilmem için her türlü desteklerini esirgemeyen fakülte dekanı sayın Prof. Dr. Richard O. Jenkins ve Doç. Dr. Parvez I. Haris'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması kapsamında olan hayvan deneyleri projesinde her türlü destek ve fedakarlığını esirmeyen Yrd. Doç. Dr. Zeki KANAY ve Yrd. Doç. Dr. Berna ERSÖZ KANAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı ve Kimya Bölümü'ne bu çalışmayı desteklediklerinden dolayı teşekkür ederim.

Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım sevgili arkadaşlarım Dr. Bircan ÇEKEN TOPTANCI, Dr. Sevil EMEN TANRIKUT, Hayrettin DİNÇ, Veysel GÜZEL ve Nesrin İNCEÖREN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın aksamaması için yurt dışı ve yurt içi izin almamda kolaylık sağlayan Diyarbakır Halk Sağlığı Müdürü sayın Fatih Mehmet ASLAN'a, Diyarbakır İl Sağlık Müdürü sayın Mehmet Sait AVAR'a ve iş yükümü paylaşan sevgili arkadaşım Nil ERTEKİN'e teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışması, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP 13-FF-48 nolu proje) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK 2012/26 nolu etik kurul kararı) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP ve DÜHADEK'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca beni seven, bana inanan, dualarını her zaman kalbimde hissettiğim ve bir ömür boyu çalışsam bile emeklerinin karşılığını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim en değerli varlığım olan annem Sittiye ALTAŞ ve babam Abbas ALTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR		I
İÇİNDEKİLER		II
ÖZET		V
ABSTRACT		VI
TABLO LİSTESİ		VII
ŞEKİL LİSTESİ		X
RESİM LİSTESİ		XIV
EK LİSTESİ		XV
DENKLEM LİSTESİ		XVI
KISALTMA VE SİMGELER		XVII
1.	**GİRİŞ**	**1**
1.1.	Reaktif Oksijen ve Reaktif Azot Türleri	1
1.1.1.	Hastalıklarda Reaktif Oksijen Türlerinin Etkisi	4
1.2.	Antioksidanlar	4
1.2.1.	Tanım ve Mekanizmaları	4
1.2.2.	Antioksidanların Etki Mekanizmaları	6
1.2.2.1.	Doğrudan Antioksidan Etki	7
1.2.2.2.	Endojen ve Ekzojen Antioksidanlar	9
1.2.3.	Antioksidan Aktivite Ölçmede Kullanılan Metotlar	10
1.2.4.	Antioksidanların Yetersiz Kaldığı Durumlar	11
1.3.	Kanser, Oluşumu ve Nedenleri	13
1.3.1.	Kanserde ROT Dengesi	14
1.4.	Apoptoz	15
1.4.1.	Tanımı ve Tarihçesi	15
1.4.2.	Apoptozun Görüldüğü Hücre Çeşitleri	16
1.4.3.	Apoptoz Morfolojisi	17
1.4.4.	Apoptoz Mekanizmaları	17
1.4.5.	Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar	18
1.5.	Antioksidan Özellik Gösteren Doğal Bileşikler	19
1.5.1.	Karotenoidler	19
1.6.	Likopen	21
1.6.1.	Likopen Oluşum Yolları	21
1.6.2.	Likopenin Biyolojik Özellikleri	23
1.6.3.	Likopenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	24
1.6.4.	Likopenin Radikal Türleri ile Tepkimeleri	26
1.6.5.	Kanserde Likopenin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi	27
1.7.	Karpuz	29
1.7.1.	Botanik Sınıflandırma	29
1.7.2.	Yöresel Adlandırma	29
1.7.3.	Morfolojik Özellikleri	29

1.7.4.	Karpuz Tarihçesi	30
1.7.5.	Habitat ve Ekonomik Değeri	30
1.7.6.	Kimyasal Bileşenleri	31
1.7.7.	Karpuzun Farmakolojik Aktiviteleri	32
1.8.	Arsenik	32
1.8.1.	Biyojenik Arsenik Kaynakları	36
1.8.2.	Arsenik Kirliliğinin Toksisitesi ve Sağlık Üzerine Etkileri	37
1.9.	Çalışmanın Amacı, Önemi ve Hedefleri	40
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**	**47**
3.	**MATERYAL VE METOT**	**55**
3.1.	MATERYAL	55
3.1.1.	Diyarbakır Karpuzu	55
3.1.1.1.	Diyarbakır'da Yetiştirilen Karpuz Çeşitleri ve Özellikleri	56
3.1.1.2.	Diyarbakır Karpuzunun Yoğun Olarak Yetiştirildiği Köyler	57
3.1.1.3.	Diyarbakır Karpuzunun Kullanıldığı Yerler	57
3.1.2.	Kullanılan Hücre Hatları	60
3.1.3.	*Vibrio fischeri* Bakterisi	61
3.1.4.	Wistar Sıçanı	62
3.1.5.	Kimyasal Malzemeler	63
3.1.6.	Kullanılan Aletler	64
3.2.	METOTLAR	65
3.2.1.	*İn Vitro* Metotlar	65
3.2.1.1.	Karpuz Suyu ve Liyofilizatın Hazırlanması	65
3.2.1.2.	Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini	66
3.2.1.3.	Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini	68
3.2.1.4.	Likopen Tayini	69
3.2.1.5.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	70
3.2.1.6.	ABTS Radikal Katyonu Kullanarak Serbest Radikal Süpürme Etkisi	71
3.2.1.7.	İndirgeme Gücü	72
3.2.1.8.	Metal Şelatlama Aktivitesi	73
3.2.1.9.	Hidroksil Radikalini Söndürme Aktivitesi	74
3.2.1.10.	Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesi	75
3.2.1.11.	Vitamin ve Şeker Tayini	76
3.2.1.12.	C Vitamini Tayini	76
3.2.1.13.	Element Analizi	77
3.2.1.14.	Protein Miktar Tayini	78
3.2.1.15.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	79
	Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması	80
3.2.1.16.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	80
	Plazmid DNA Saflaştırma	82
3.2.2.	Hücre Canlılığı Çalışmaları	83
3.2.2.1.	Hücre Kültürleri	83

3.2.2.2.	MTT Deneyi	83
3.2.3.	Toksisite Testi	84
3.2.4.	*İn Vivo* Metotlar	87
3.2.4.1.	Hayvan Deneyleri	87
3.2.4.2.	Vücut Ağırlık Takibi	88
3.2.4.3.	Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	89
3.2.4.4.	Doku Homojenatlarının Hazırlanması	89
3.2.4.5.	Biyokimyasal Analizler	89
3.2.4.6.	Protein Miktar Tayini	89
3.2.4.7.	Protein Karbonil Miktar Tayini	90
3.2.4.8.	Lipid Peroksidasyonu	91
3.2.4.9.	Katalaz Aktivitesi Tayini	92
3.2.5.	İstatiksel Analiz	93
4.	**ARAŞTIRMA BULGULARI**	**95**
4.1.	*İn Vitro* Metotlar	95
4.1.1.	Toplam Fenolik Bileşen, Flavonoid Bileşen ve Likopen Miktar Tayini	95
4.1.2.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	95
4.1.3.	ABTS Radikal Katyonu Kullanarak Serbest Radikal Süpürme Etkisi	97
4.1.4.	İndirgeme Gücü	99
4.1.5.	Metal Şelatlama Aktivitesi	101
4.1.6.	Hidroksil Radikalini Söndürme Aktivitesi	101
4.1.7.	Hidrojen Peroksit Süpürme Etkisi	102
4.1.8.	Vitamin ve Şeker Tayini	103
4.1.9.	C Vitamini Tayini	104
4.1.10.	Element Analizi	105
4.1.11.	Protein Miktar Tayini	107
4.1.12.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	107
4.1.13.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	109
4.2.	Hücre Canlılığı Çalışmaları	110
4.2.1.	MTT Deneyi	110
4.3.	Toksisite Testi	113
4.4.	*İn Vivo* Metotlar	115
4.4.1.	Vücut Ağırlık Takibi	115
4.4.2.	Biyokimyasal Analizler	116
4.4.3.	Protein Miktar Tayini	119
4.4.4.	Protein Karbonil Miktar Tayini	120
4.4.5.	Lipid Peroksidasyonu	121
4.4.6.	Katalaz Aktivitesi Tayini	123
5.	**TARTIŞMA ve SONUÇ**	**125**
6.	**KAYNAKLAR**	**165**
	EKLER	**179**
	ÖZGEÇMİŞ	**185**

ÖZET

DİYARBAKIR KARPUZU'NUN *İN VİVO* VE *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Sevcan ALTAŞ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

2015

Karpuz, Dünya'da ve Türkiye'de üretim ve tüketim değeri yüksek olan bir meyvedir. Ülkemizde karpuz üretimi Çukurova Bölgesi'nin yanı sıra, iklimin uygun olduğu Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde de geniş çaplı yapılmaktadır. Diyarbakır karpuzu olarak ünlenen yöre karpuzu *Citrullus lanatus* türüne ait "Sürme" çeşididir. Bu çeşit, diğerlerine göre bol lifli olmasından dolayı tıbbi değeri bulunmaktadır. Diyarbakır karpuzu, Dicle nehri kıyısında yetiştirilen yöresel bir çeşittir. Bunun antioksidan aktivitesi ve organizma üzerine olan etkileri hakkında literatürde veri bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, Diyarbakır karpuzunun suyu ve liyofilizatının *in vitro* antioksidan özellikleri incelenip vitamin, şeker ve element analizleri yapıldı. Liyofilizatın hücre canlılığı ve toksisitesi üzerine etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) ve mikrotoks deneyleri ile test edildi. Ayrıca, As(III) ile doku hasarı oluşturulmuş sıçanlarda karpuz suyu ve liyofilizatının *in vivo* lipid peroksidasyonunu önleme etkileri, karaciğer fonksiyon testleri ve katalaz aktivitesine olan etkisi araştırıldı.

Sonuç olarak, Diyarbakır karpuz suyu ve liyofilizatının *in vitro* çalışmalarda antioksidan aktivitesinin olduğu, çalışılan kanser hücre hatlarına karşı inhibisyon etkisinin bulunduğu, *in vivo* çalışmalarda ise sıçanlarda oluşturulan arsenik toksisitesi sonucu meydana gelen protein karboksilasyonu ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı. Bununla birlikte, Diyarbakır karpuzunun vitamin ve insan vücudu için gerekli olan ana grup elementler Na, K, Ca ve Mg ile eser elementler olan Fe, Mn, Zn, Co, Cu ve Se bakımından zengin olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Diyarbakır karpuzu, antioksidan aktivite, likopen, arsenik toksisitesi, MTT

ABSTRACT

IN VIVO AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF DIYARBAKIR WATERMELON

PhD THESIS

Sevcan ALTAŞ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF DICLE

2015

Watermelon is a fruit species with high value of production and consumption in the world and Turkey. In Turkey, watermelon is adaptable to be grown widely both in Çukurova region as well as where appropriate climate region of Southeastern Anatolia. The watermelon known as Diyarbakır watermelon is "Sürme" type, which belongs to *Citrullus lanatus* species. This type has high medicinal value due to its fiber content. Diyarbakır watermelon is a local type grown on the banks of the Tigris River. There is no data in the literature on its antioxidant activity and effects on organisms.

The present thesis was undertaken to evaluate *in vivo* and *in vitro* antioxidant properties of Diyarbakır watermelon juice and lyophilisates. The vitamins, sugar and elemental analysis of Diyarbakır watermelon were also performed. The effect of lyophilisate on cell viability and toxicity was investigated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and microtox experiments. *In vivo* lipid peroxidation and protein carboxylation inhibition effects of watermelon juice and lyophilisates on arsenic-induced damages on tissues in rats as well as their effects on liver function tests and catalase activity were also investigated.

Consequently, Diyarbakır watermelon juice and lyophilisate were found to have *in vitro* antioxidant activity and the inhibition effect against three human cancer cell lines. It was also observed that, watermelon juice and lyophilisate were found to have a protective effect against *in vivo* lipid peroxidation and protein carboxylation on arsenic-induced toxicity in rats. Also, Diyarbakır watermelon was found to be rich with vitamins and the main group elements necessary for human body Na, K, Ca, Mg and trace elements such as Fe, Mg, Mn, Zn, Co, Cu and Se.

Key words: Diyarbakır watermelon, antioxidant activity, lycopene, arsenic toxicity, MTT

TABLO LİSTESİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.2.2.	En yaygın kullanılan antioksidan maddeler ve etki mekanizmaları	6
Tablo 1.2.2.2.	Serbest radikal hasarına karşı antioksidanların koruyucu rolü	10
Tablo 4.1.1.	Karpuz suyu ve liyofilizatın toplam fenolik, toplam flavonoid ve likopen analizi	95
Tablo 4.1.2.	Karpuz suyu (5-15-25-50-100-150µl/ml), liyofilizat ve pozitif kontrol (5-15-25-50-100-150µg/ml) çözeltilerinin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi	96
Tablo 4.1.3.	Karpuz suyu (5-15-25-50-100 µl/ml), liyofilizat, BHT ve trolox (5-15-25-50-100 µg/ml) çözeltilerinin % ABTS radikalini söndürme aktivitesi	98
Tablo 4.1.3. (Devamı)	Karpuz suyu (5-15-25-50-100 µl/ml), liyofilizat, quercetin ve askorbik asit (5-15-25-50-100 µg/ml) çözeltilerinin % ABTS radikalini söndürme aktivitesi	98
Tablo 4.1.4.	Liyofilizat ve pozitif kontrollerin (BHA, BHT, α-Tokoferol) farklı konsantrasyonlarda (50,100 ve 250 µg/ml) Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analizi	100
Tablo 4.1.5.	Karpuz suyu (1 ml/ml), liyofilizat ve EDTA (0.1 mg/ml ve 1 mg/ml) çözeltilerinin % metal şelatlama aktivitesi spektrofotometrik analizi	101
Tablo 4.1.7	Karpuz suyu (50-1000 µl/ml) ile liyofilizat (50-1000 µg/ml) ve askorbik asidin (50-1000 µg/ml) % hidrojen peroksit süpürme aktivitesi titrimetrik analizi	102
Tablo 4.1.8.	Karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan vitamin ve şeker miktarları	104
Tablo 4.1.9.	Karpuz suyu, liyofilizat ve limon suyunun titrimetrik yöntemle C vitamini tayini	104
Tablo 4.1.10.1.	Karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan bazı element miktarlarının ICP-OES cihazı ile elde edilen verileri	105
Tablo 4.1.10.2.	Liyofilizatta bulunan element (Na, K, Ca, Mg) miktarları	106
Tablo 4.1.10.3.	Liyofilizatta bulunan element (Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Se) miktarları	106

Tablo 4.1.10.4.	Liyofilizatta bulunan element (Al, As, Pb, Cr, Cd) miktarları	106
Tablo 4.1.10.4. (Devamı)	Liyofilizatta bulunan element (Ni, Sr, Ba, V, U) miktarları	106
Tablo 4.1.11.	Liyofilizatta bulunan protein miktarının Standart Bradford ve Mikro Bradford metoduna göre HSA ekivalent değerleri	107
Tablo 4.2.1.1.	Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi	110
Tablo 4.2.1.2.	Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının % inhibisyonu üzerine etkisi	111
Tablo 4.3.1.	Karpuz suyu liyofilizatının farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi	113
Tablo 4.3.2	Fenolün farklı konsantrasyonlarda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi	114
Tablo 4.4.2.1.	Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki kan şekeri (Glu), trigliserid (Trig) ve kolesterol (Chol) değerleri	117
Tablo 4.4.2.1. (Devamı)	Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki kan şekeri (Glu), trigliserid (Trig) ve kolesterol (Chol) değerleri	117
Tablo 4.4.2.2	Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin ve albumin değerleri	118
Tablo 4.4.2.2 (Devamı)	Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin ve albumin değerleri	118
Tablo 4.4.5.1.	Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki ortalama vücut ağırlıkları ile bütün gruplarda sıçan karaciğer dokularının 14 gün sonraki protein miktarı, protein karbonil miktarı ve lipid peroksidasyonu analizi	122

Tablo 4.4.5.2. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki ortalama vücut ağırlıkları ile bütün gruplarda sıçan karaciğer dokularının 28 gün sonraki protein miktarı, protein karbonil miktarı ve lipid peroksidasyonu analizi 122

Tablo 4.4.6.1. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki katalaz aktivitesi ve spesifik katalaz aktivitesi 123

Tablo 4.4.6.2. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki katalaz aktivitesi ve spesifik katalaz aktivitesi 124

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.1.1.	Oksidatif stres oluşumu ve etkileri	2
Şekil 1.1.2.	Vücutta üretilen reaktif oksijen (ROT) ve reaktif azot (RAT) türleri	3
Şekil 1.2.1.	Hidrokarbon oto-oksidasyonu ve antioksidan koruma mekanizması	5
Şekil 1.2.2.2.	En yaygın antioksidanların sınıflandırılması	9
Şekil 1.4.1.	Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) aşamaları	15
Şekil 1.4.2.	Kurbağa ve insan embriyosunda apoptozis	16
Şekil 1.4.5.	Hücrede apoptoz ve nekroz gelişimi	18
Şekil 1.5.1.	Şematik olarak yumurta sarısı fosfatidilkolin (EYPC) zarında bazı karotenoidlerin gösterimi	20
Şekil 1.6.1.	Siyanobakteri ve bitkilerde karotenoid biyosentez mekanizması	22
Şekil 1.6.3.	Likopenin all-*trans* ve *cis* izomerik formları	25
Şekil 1.8.1.	İnsanlarda arseniğin biyometilasyonu	33
Şekil 1.8.2.	Doğada arsenik döngüsü	34
Şekil 1.8.3.	Arsenik maruziyetinin kaynakları ve çeşitli arsenik zehirlenmesi biçimleri	39
Şekil 3.2.1.1.	Gallik asit molekül yapısı	66
Şekil 3.2.1.2.	Standart gallik asit grafiği	67
Şekil 3.2.1.3.	Quercetin molekül yapısı	68
Şekil 3.2.1.4.	Standart quercetin grafiği	69
Şekil 3.2.1.5.	DPPH molekülünün antioksidan varlığında indirgenmesi	70
Şekil 3.2.1.6.	ABTS radikal katyonunun antioksidan varlığında indirgenmesi	72

Şekil 3.2.1.7.	Ferrozin molekülü	73
Şekil 3.2.1.8.	Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu	74
Şekil 3.2.1.9.	Tillman reaktifinin askorbik asit ile indirgenmesi tepkimesi	77
Şekil 3.2.1.10.	İnsan serum albümininin (HSA) A. Standart bradford metodu ve B. Mikro bradford metoduna göre standart grafikleri	79
Şekil 3.2.2.1.	MTT'de bulunan tetrazolyum halkasının mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından kesimi	83
Şekil 3.2.4.1.	Standart BSA grafiği	90
Şekil 3.2.4.2.	Standart TMP grafiği	92
Şekil 4.1.2.	Karpuz suyu (5-15-25-50-100-150 µl/ml), liyofilizat ve pozitif kontrol (5-15-25-50-100-150 µg/ml) çözeltilerinin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi	96
Şekil 4.1.3.	Karpuz suyu (5-15-25-50-100 µl/ml), liyofilizat ve pozitif kontrol (5-15-25-50-100 µg/ml) çözeltilerinin % ABTS radikalini söndürme aktivitesi	99
Şekil 4.1.4.	Liyofilizat ve pozitif kontrollerin (BHA, BHT, α-Tokoferol) farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 µg/ml) Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analizi	100
Şekil 4.1.7.	Karpuz suyu (50-1000 µl/ml) ile liyofilizat (50-1000 µg/ml) ve askorbik asidin (50-1000 µg/ml) % hidrojen peroksit süpürme aktivitesi titrimetrik analizi	103
Şekil 4.1.12.1.	(A) Fenton reaksiyonu [$FeCl_2$ (1.0 mM), EDTA (1.0 mM) ve H_2O_2 (2.0 mM)] sonucu oluşan hidroksil radikallerinin sığır serum albümininde (BSA, 2.0 mg/ml) meydana getirdiği oksidatif hasara karşı liyofilizatın (0.2-0.4 mg/ml) koruyucu etkisinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelenmesi. (B) Her kuyucukta oksidatif hasara karşı korunmuş BSA yüzdeleri	108
Şekil 4.1.12.2.	(A) Fenton reaksiyonu [$FeCl_2$ (1.0 mM), EDTA (1.0 mM) ve H_2O_2 (2.0 mM)] sonucu oluşan hidroksil radikallerinin sığır serum albümininde (BSA, 2.0 mg/ml) meydana getirdiği oksidatif hasara karşı bütillenmiş hidroksi toluenin (BHT, 0.2-4.0 mg/ml) (0.2-0.4 mg/ml) koruyucu etkisinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelenmesi. (B) Her kuyucukta oksidatif hasara karşı korunmuş BSA yüzdeleri	108
Şekil 4.1.13.	(A) Liyofilizatın supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan	

	hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisinin agaroz jel elektroforezi. (B) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II yüzdeleri	109
Şekil 4.2.1.1.	Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi	111
Şekil 4.2.1.2.	Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının inhibisyonu üzerine etkisi	112
Şekil 4.3.1.	Karpuz suyu liyofilizatının farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi	113
Şekil 4.3.2.	Fenolün farklı konsantrasyonlarda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi	114
Şekil 4.4.1.	Sıçanların 14 gün ve 28 gün sonraki ortalama ağırlıkları	116
Şekil 4.4.3.	Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün ve 28 gün sonraki protein miktar tayini	119
Şekil 4.4.4.	Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün ve 28 gün sonraki protein karbonil miktar tayini	120
Şekil 4.4.5.	Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün ve 28 gün sonraki MDA tayini	121
Şekil 5.1.1.	Kararlı serbest radikal DPPH yapısı	127
Şekil 5.1.2.	DPPH molekülünün serbest radikal X ile tepkimesi	127
Şekil 5.1.3.	Sitrulin ve arginin amino asitleri	137
Şekil 5.1.4.	Fe^{3+}'ün NADH ile indirgenmesi, Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile tekrar yükseltgenmesi ve DNA hasarı oluşumu	139
Şekil 5.1.5.	Antioksidan aktivite mekanizmaları	141
Şekil 5.2.1.	Hücre döngüsü aşamaları	144
Şekil 5.4.1.	Arseniğin enzim sistemi çalışmasını bloke etmesi	158

Şekil 5.4.2.	Arseniğin ATP oluşumunu engelleme reaksiyonu	158
Şekil 5.4.3.	Arsenik zehirlenmesi mekanizması	159
Şekil 5.4.4.	Karpuzun oksidatif streste etkilediği biyokimyasal durumlar	160
Şekil 5.4.5.	Oksidatif hücresel hasar mekanizmaları	163

RESİM LİSTESİ

Resim		Sayfa
Resim 3.1.1.	Diyarbakır Karpuzu	58
Resim 3.1.2.	Diyarbakır karpuzu ve karpuz yetiştiricisi	59
Resim 3.1.3.	Kültür ve Karpuz Festivali'nde sergilenen karpuzlar	59
Resim 3.1.4.	İnsan karaciğer karsinoma hücre hattı (HepG2)	60
Resim 3.1.5.	İnsan göğüs kanseri hücre hattı (MCF-7)	60
Resim 3.1.6.	İnsan koryokarsinom hücre hattı (BeWo)	60
Resim 3.1.7.	*Vibrio fischeri* bakterisinin mürekkep balığı ve petri kutusundaki görüntüsü	61
Resim 3.1.8.	Wistar albino sıçanı	62
Resim 3.2.1.1.	Karpuz suyu ve liyofilizatının hazırlanması	65
Resim 3.2.2.1.	Hücre hattının 96 kuyucuklu tabakaya ekimi	85
Resim 3.2.2.2.	Hücre hattı çoğalmasının mikroskop ile incelenmesi	85
Resim 3.2.2.3.	Hücre hattının büyüme tamponunun değiştirilmesi	86
Resim 3.2.2.4.	Hücre hattına MTT deneyi uygulanması	86
Resim 3.2.4.1.	Sıçanların gruplandırılması	88

EK LİSTESİ

Ek		Sayfa
Ek 1	Vitamin analizi için HPLC ayarları	179
Ek 2	Şeker analizi için HPLC ayarları	179
Ek 3	Mikrodalga çözünürleştirme sistemi sıcaklık tablosu	179
Ek 4	ICP-OES cihazı çalıştırma koşulları	180
Ek 5	Protein Miktar Tayini Reaktifleri	181
Ek 6	Diyarbakır Karpuzu Coğrafi İşaret Tescil Belgesi	182
Ek 7	Etik Kurul Kararı	183

DENKLEM LİSTESİ

Denklem		Sayfa
Denklem 1	Standart gallik asit (toplam fenolik miktarı) denklemi	67
Denklem 2	Standart quercetin (toplam flavonoid miktarı) denklemi	69
Denklem 3	Likopen içeriği tayini denklemi	70
Denklem 4	DPPH radikalini söndürme aktivitesi (%)	71
Denklem 5	ABTS radikal katyonu söndürme aktivitesi (%)	72
Denklem 6	Metal şelatlama aktivitesi (%)	74
Denklem 7	Hidroksil radikalini söndürme aktivitesi (%)	75
Denklem 8	Hidrojen peroksit süpürme aktivitesi (%)	75
Denklem 9	Standart HSA (liyofilizat protein miktarı) denklemi (mg)	78
Denklem 10	Standart HSA (liyofilizat protein miktarı) denklemi (µg)	78
Denklem 11	DNA inhibisyonu (%)	81
Denklem 12	Hücre hattı (MCF-7, HepG2 ve BeWo) canlılığı (%)	84
Denklem 13	Hücre hattı (MCF-7, HepG2 ve BeWo) inhibisyonu (%)	84
Denklem 14	Standart BSA (doku protein miktarı) denklemi (µg)	90
Denklem 15	Protein karbonil miktarı (nmol/ml)	91
Denklem 16	Protein karbonil miktarı (nmol/mg)	91
Denklem 17	Standart TMP (MDA miktarı) denklemi	92
Denklem 18	Katalaz aktivitesi	93
Denklem 19	Spesifik katalaz aktivitesi	93

KISALTMA VE SİMGELER

µ : Mikro
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
AIDS : Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu
ALT : Alanin aminotransferaz
ANOVA : Varyans analizi
APL : Akut promiyelositik lösemi
AS3MT : Arsenik metil transferaz
AST : Aspartat aminotransferaz
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adenozin trifosfat
BeWo : İnsan koryokarsinom hücresi
BHA : Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT : Bütillenmiş hidroksi toluen
BSA : Sığır serum albumini
CAT : Katalaz
COX-2 : Siklooksigenaz-2
CRP : c-reaktif protein
CSF : Koloni uyarıcı sistem
ctDNA : Kloroplast DNA
dk : Dakika
DMA : Dimetil arsenöz asit
DMAPP : Dimetilalil pirofosfat
DMEM : Bazal besiyeri
DMSO : Dimetil slfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
DNPH : 2,4-dinitro fenilhidrazin
DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DÜBAP : Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
DÜHADEK : Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
EDTA : Etilendiamin tetraasetikasit
EPA : Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EYPC : Yumurta sarısı fosfatidilkolin
FCR : Folin-ciocaltaeu reaktifi
FRAP : Ferrik indirgeme antioksidan gücü
g : Gram
GAE : Gallik asit eşdeğeri
GAFJ-1 : Fosfor yokluğunda yerine çoğunlukla zehirli olan arseniği kullanabilen bakteri türü
GC-MS : Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
GGPP : Geranilgeranil pirofosfat
GGPS : Geranilgeranil pirofosfat sentaz

GJC : Gap junction connections
GPx : Glutatyon peroksidaz
GSH : Glutatyon
GSSG : Glutatyon disulfit, indigenmiş glutatyon
GST : Glutatyon S-transferaz
HDL : Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HepG2 : İnsan karaciğer kanser hücresi
HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSA : İnsan serum albümini
IARC : Arsenik Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IC_{50} : Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
ICP-MS : İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma kütle spektrometresi
ICP-OES : İndüktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi
IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGIF-1 : İnsülin benzeri büyüme faktörü
IPP : İzopentenil pirofosfat
İZSU : İzmir Su ve Kanalizasyon Genel Müdürlüğü
Kar : Karotenoid
kg : kilogram
KOSGEB : Küçük ve Orta Ölçekli İşletmeleri Geliştirme ve Destekleme İdaresi Başkanlığı
KVH : Kardiyo vasküler hastalıklar
LDH : Laktat dehidrogenaz
LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein
LNCaP : İnsan prostat kanser hücresi
LPO : Lipid peroksidasyonu
LYC : Likopen siklaz
m : Mili
MALDİ/TOF : Matriks yardımlı lazer iyonizasyon kütle spektrometreler
MCF-7 : İnsan meme kanseri hücresi
MDA : Malondialdehit
MMA : Monometil arsenöz asit
MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NGF : Nöron büyüme faktörü
NO : Nitrik oksit
NOS : Nitrik oksit sentaz
NSAID : Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaç
ORAC : Oksijen radikal kapasitesi
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS : Fosfat tamponu
PCO : Protein karbonil
PN : Peroksinitrit

ppb : Milyarda bir
PSY : Fiton sentaz
QUE : Quercetin eşdeğeri
RAT : Reaktif azot türleri
RelA : NF-kappa-B p65 altbirim
RF-HPLC : Ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi
ROT : Reaktif oksijen türleri
RPMI : Bikarbonat tampon sistemi
SAH : S-adenozil-L-homosistein
SAM : S-adenozil metiyonin
SÇKM : Suda çözünür kuru madde miktarı
SD : Standart sapma
SDS : Sodyum dodesil sülfat
SOD : Süperoksid dismutaz
SRM : Standart referans materyal
TBA : 2-tiyobarbitürik asit
TBARS : Tiyobarbütirik asit reaktif türler
TBHQ : Tersiyel butil hidrokinon
TC : Toplam kolesterol
TCA : Trikloro asetik asit
TEAC : Troloks ekivalent antioksidan kapasite
TEMED : Tetrametil etilenediamin
TG : Trigliserit
TMP : Tetrametoksipropan
TNF : Tümör nekroz faktör
TOH : Tokoferol
TPE : Türk Patent Enstitüsü
TUİK : Türkiye İstatistik kurumu
UDCA : Ursodeoksikolik
UV-VIS : Ultraviyole-görünür
VLDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
XO : Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık kazandırır. Kararlı bileşiklerin elektronları eşlenmiş halde bulunur. Bir ya da daha fazla sayıda ortaklanmamış elektrona sahip atom veya moleküllere "serbest radikaller" denir. Ancak Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler fakat, serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikallerdeki eşlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürürler. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder.

Serbest radikaller organizmada normal metabolik faaliyetlerin yan ürünü olarak, radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile oluşur (Gökpınar ve ark. 2006).

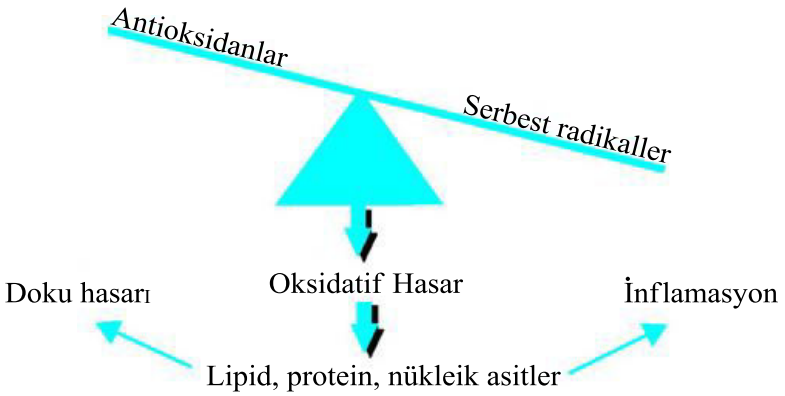
1.1. Reaktif Oksijen ve Reaktif Azot Türleri

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş tepkimeye girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca etkileşir. Bundan dolayı, O_2 reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir (Dawn ve ark. 1996). Reaktif oksijen türleri (ROT) oksijen içeren kimyasal olarak reaktif oksijen molekülleridir.

ROT normal fizyolojik olaylar sırasında oluşur ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatıp, lipid peroksitlerin birikmesine öncülük ederler (Halliwell 1999).

Hücrede normal metabolik yollarda gerçekleşen enzimatik reaksiyonlarda, enzimlerin aktif yerinde ara ürün olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Bazen bu ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle etkileşerek serbest

oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar. Hücrede oluşan ROT, antioksidan savunma sistemleri ile etkisizleştirilir, bu bir denge halindedir (Şekil 1.1.1). Ancak, bazen bu denge bozulur, hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla etkisizleştirilen serbest radikallere kıyasla daha fazla ROT oluşabilir. Bu durum "oksidatif stres" olarak tanımlanır (Halliwell 1999).



Şekil 1.1.1. Oksidatif stres oluşumu ve etkileri

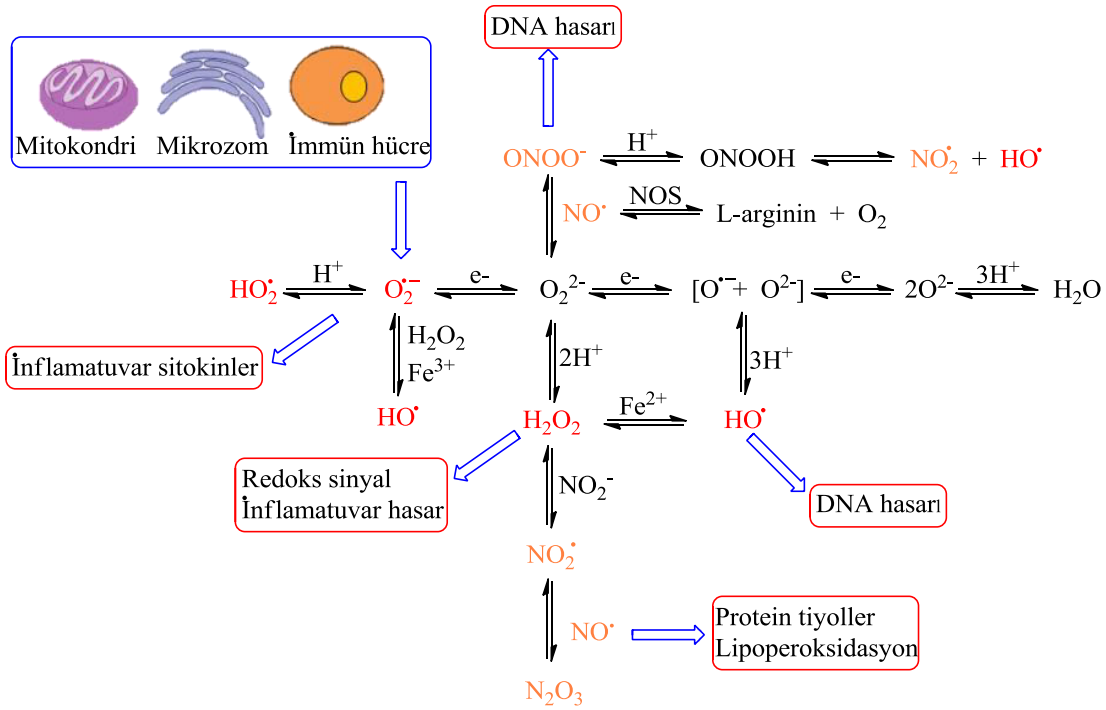
Bir orbitalinde tek elektron bulunduran NO, NO_3 gibi moleküller reaktif azot türleri (RAT) olarak sınıflandırılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2000).

ROT ve RAT serbest radikallerle birlikte radikal olmayan türleri de kapsamaktadır. Başlıca ROT; süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$), peroksil radikali ($RO_2^{\bullet}$), alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$), singlet oksijen ($^1O_2$), hipokloröz asit (HOCl) ve ozon (O_3)'dur. Başlıca RAT; nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitröz asit (HNO_2), diazot tetraoksit (N_2O_4), diazot trioksit (N_2O_3) ve nitronyum katyonu (NO_2^+)'dur (Martinez ve Andriantsitohaina 2009) (Şekil 1.1.2).

En yaygın ROT/RAT kaynakları mitokondri, mikrozomlar (sitokrom P450 enzimleri), ksantin oksidaz (XO) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz (NOX)'dır. Bununla birlikte, fagosiztozda miyeloperoksidaz ve eozinofil peroksidazlar da ROT üretir (Saso ve Firuzi 2014).

Metabolik yolaklardaki bazı patolojik değişiklikler ROT ve RAT'de artışa sebep olmaktadır. Bu durumlara örnek olarak; yüksek tansiyon, ateroskleroz ve diyabette tipik

olarak nitrik oksit sentaz enziminin (NOS) "ayrılma" durumu verilebilir (Roe ve Ren 2012). Normal koşullarda, tetrahidrobiopterin (BH_4) varlığında NOS'ın L-arjinini L-sitruline dönüştürmesi ile NO oluşur. Ancak, ROT'un BH_4'ü dihidrobiopterin (BH_2)'e yükseltgemesine bağlı olarak BH_4 veya arjininin konsantrasyonundaki aşırı düşüş NOS'ın moleküler oksijenden $O_2^{\bullet-}$ üretmesine neden olabilmektedir. $O_2^{\bullet-}$ da NO ile etkileşerek RAT olan peroksinitriti (PN) oluşturur, PN daha sonra BH_4 seviyesini düşürür ve NOS doğrudan zarar görür. Bu durum, ROT ve RAT seviyesinin yükselmesine neden olurken NO seviyesini düşürmektedir. Bu durumlarda BH_4 ve L-arjinin takviyesinin faydalı olduğu rapor edilmektedir (Alp ve Channon 2004, Saso ve Firuzi 2014).



Şekil 1.1.2. Vücutta üretilen reaktif oksijen (ROT) ve reaktif azot (RAT) türleri (Roleira ve ark. 2015)

1.1.1. Hastalıklarda Reaktif Oksijen Türlerinin Etkisi

Reaktif oksijen türleri birçok hastalığın patogenezinde rol almaktadır. Bu hastalıklar üç ana gurupta toplanabilir:

1. Genetiğe bağlı hastalıklar (Fanconi anemisi, bloom sendromu)

2. Çevresel etkenlerle oluşan hastalıklar (meslek hastalıkları, zehirlenmeler, virüs ve bakteriyal enfeksiyonlar)

3. Hem genetik hem de çevresel etkenlerle oluşan hastalıklar (bronşiyal astım, diyabet, kanser, kardiyo vasküler hastalıklar (KVH) ve diğerleri)

Serbest radikallerin rol aldığı hastalıklarla ilgili durumlar şöyle sıralanmaktadır; inflamasyon, oksijen ve diğer gazların zehir etkileri, yaşlanma, radyasyon, damar sertliği ve DNA hasarları. Bu durumlarda ROT oluşum ve temizlenmesi arasındaki denge bozulmuştur. Bu hastalıklardan olan kanser ve KVH'da ROT etkisi ve antioksidanların bu hastalıkları önlemede veya tedavi etmede etkili olup olmadığı çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. ROT'un spesifik moleküler etkilerinin KVH ve kanserin çeşitli risk faktörlerinde bilinmesi bunların tedavisinde antioksidanların etkisinin araştırılmasını önemli kılmaktadır (Seifried ve ark. 2007).

1.2. Antioksidanlar

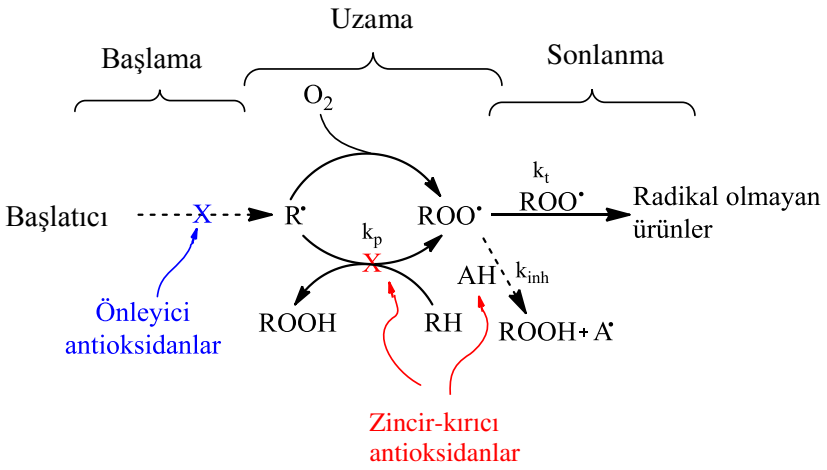
1.2.1. Tanım ve Mekanizmaları

Antioksidanlar vücudu serbest radikal etkilerinden korur ve birçok kronik hastalık etkilerini geciktirir. Bu özelliklerinden dolayı antioksidan bileşiklere olan ilgi artmış, son yıllarda özellikle bitki kaynaklı antioksidanlar araştırma konusu olmuştur (Lanigan ve Yamarik 2002).

Doğal ürün çalışmalarında kullanılan yaygın antioksidan tanımı, "radikaller ile tepkimeye girebilen moleküller" veya "indirgeme gücü sağlamak suretiyle radikallerin sebep olduğu oksidatif stresi etkisiz hale getirmek" şeklinde açıklanmaktadır. Bu tanım, doğal özüt veya izole edilen fitokimyasalların (bitkilerde biyolojik aktif kimyasallar) antioksidan aktivitelerini analiz etmek için geliştirilmiş testlerin kimyasal mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu yaklaşım, potansiyel antioksidan ile renkli DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) veya ABTS (2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-

sulfonik asit)) gibi bazı serbest radikallerin veya Fe^{3+} gibi yükseltgen olmayan bazı radikal türlerinin (örn. FRAP deneyi) tepkimelerine dayanmakla birlikte, tamamen doğru değildir (Amorati ve ark. 2013).

Antioksidanlar, korudukları materyal ile karşılaştırıldıkları zaman çok az miktarda bile (<%1, çoğunlukla 1-1000 mg/l) bu materyalin oksidasyonunu geciktirici veya yavaşlatıcı etki yapabilen bileşiklerdir. Biyolojik sistemler veya gıda biliminde en yaygın olarak lipidler, proteinler, karbohidratlar ve küçük oranda da hayvan veya bitkisel dokuları oluşturan diğer organik moleküllerin oksidasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bunların oksidasyonu paralelinde, hidrokarbon oto-oksidasyonu ile yürüyen peroksi radikalleri ($ROO^{\cdot}$) aracılığıyla bir radikal zincir reaksiyonu meydana gelmektedir (Valgimigli ve Pratt 2012). Bu tepkimeler Şekil 1.2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.2.1. Hidrokarbon oto-oksidasyonu ve antioksidan koruma mekanizması (Amorati ve ark. 2013)

Şekil 1.2.1'de özetlenen zincir reaksiyonu, bu süreci başlatan radikalin yapı veya orijinine bağlı kalınmaksızın substrat RH (örneğin; lipid) ile reaksiyona girip (çoğunlukla H-atomu koparark) bir alkil radikali $R^{\cdot}$ oluşturan, daha sonra oksijenle reaksiyona girerek bir peroksi radikali ($ROO^{\cdot}$) oluşturabilen bazı radikal türleri ile başlatılır. Döngüsel olarak, peroksi radikali bir hidroperoksit ROOH ve başka bir radikal oluşturmak için başka biyolojik bir moleküle saldırır. Bu zincir reaksiyonu iki radikal türü tesadüfen karşılaşıp birbirini söndürene kadar devam etmektedir, buna

sonlanma basamağı denilmektedir. Başlama ve sonlanma arasındaki döngüler toplamı "zincir uzunluğu"dur (Amorati ve ark. 2013).

Bu radikal zincir tepkimelerini yavaşlatıcı etki gösterebilen bileşiklere "doğrudan antioksidanlar" denilmektedir (Valgimigli ve Pratt 2012).

1.2.2. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Bazı durumlarda antioksidanların hangi mekanizma aracılığıyla yararlı etki gösterdikleri günümüzde henüz tam anlamıyla açıklanamamıştır (örneğin; diyetle alınan antioksidanlar) (Saso ve Firuzi 2014). Bazı antioksidanlar ve etki mekanizmaları Tablo 1.2.2'de verilmektedir.

Tablo 1.2.2. En yaygın kullanılan antioksidan maddeler ve etki mekanizmaları (Saso ve Firuzi 2014)

Mekanizma	**Ana antioksidan sınıfı (örnekler)**
Doğrudan antioksidan etki	Polifenolikler (flavonoidler, kumarinler, hidroksisinamik asitler)
Antioksidan enzimlerin artması	eNOS başlatıcılar (AVE9488, AVE3085) HO-1 başlatıcılar (probukol)
Nrf2 aktifleştirme	Triterpenoidler (bardoksolon metil)
Sirtuin aktivitesini yükselten	Stilbenoidler (resveratrol)
Urik asit seviyesini yükseltenler	Polifenolikler (flavonoidler)
Pro-oksidan etkiyi düzenleyenler	Polifenolikler (flavonoidler)
Antioksidan enzimleri taklit etme	SOD taklit edenler (ebselen, nitroksitler)
Pro-oksidan enzimlerin inhibisyonu	NOX inhibitörleri (triazolopirimidinler) XO inhibitörleri (flavonoidler) 5-Lipoksigenaz inhibitörleri (kafeik asit plenetil ester) Siklooksigenaz inhibitörleri (nimesulid)
Endojen düşük molekül ağırlıklı antioksidanların rejenerasyonu	Vitaminlerin rejenerasyonu (lipoik asit) Glutatyon rejenerasyonu (N-asetilsistein)

1.2.2.1. Doğrudan Antioksidan Etki

Antioksidanlar ROT ve RAT'ı doğrudan söndürdükleri gibi metaller ile de doğrudan etkileşirler (metal şelatlama). En iyi bilinen antioksidanlardan olan melatonin ve kurkuminin hem doğrudan serbest radikal söndürücü hem de endojen antioksidan yanıtı uyarıcı etki gösterdiği rapor edilmektedir (Saso ve Firuzi 2014).

ROT ve RAT ile belli koşullarda doğrudan etkileşim en önemli mekanizmalardandır. Ancak bu antioksidan etkiyi açıklayan tek mekanizma değildir, araştırmacılar tarafından farklı mekanizmalar da önerilmiştir (Saso ve Firuzi 2014).

Polifenolik bileşiklerin doğrudan antioksidan etki gösterebildikleri yerlerden bir tanesi sindirim kanalıdır. Polifenolik bileşikler sindirim kanalında yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Hu 2011). Benzer şekilde, sürekli UV radyasyonuna ve serbest radikal oluşumuna maruz kalan cilt hücreleri de aynı zamanda antioksidanların doğrudan söndürme etkilerinden faydalanırlar (Stahl ve Sies 2012).

Diyetle alınan birçok polifenolik bileşiğin yetersiz emilim ve ilk geçiş etkisi (metabolizması) sonucu kandaki konsantrasyonu düşüktür. Bunun sonucu olarak, sınırlı radikal söndürme aktivitesi gösterirler (Hollman ve ark. 2011). Buna rağmen, bu bileşiklerin metabolitleri antioksidan etki göstermektedir. Flavonoid metabolitlerinin vasküler doku ve aterosklerotik lezyonlara ulaşarak antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir (Saso ve Firuzi 2014).

Doğrudan antioksidanlar etki mekanizmalarına bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar (Valgimigli ve Pratt 2012).

a) Önleyici antioksidanlar başlama aşamasına saldırırlar, yani; radikal oluşumunu yavaşlatırlar. Katalaz enzimi ve metal şelatlayıcılar örnek verilebilir. Redoks aktif metal iyonları (örnek; Fe^{2+}) yükseltgenmiş forma (örnek; Fe^{3+}) dönüştürülerek durdurulur, metal şelatlayıcılar en önemli radikal başlatma süreci olan Fenton tepkimelerinin meydana gelmesini engelleyebilmektedir (Valgimigli ve Pratt 2012) (Şekil 1.2.1).

b) Zincir kırıcı antioksidanlar uzama tepkimeleriyle yarışarak oto-oksidasyonu yavaşlatır veya durdururlar, yani; peroksil radikalleriyle yükseltgenebilen substrattan çok daha hızlı bir şekilde reaksiyona girerek oksidasyon zincirini yaymayan türleri oluştururlar. Zincir reaksiyon süreci başladıktan sonra koruyucu antioksidanlar etkisini

kaybeder. Zincir-kırıcı antioksidanlar doğrudan antioksidanların en önemlileridir, bunların başlıca etkinlikleri peroksil radikalleri (gerçek zincir-taşıyıcı türler) ile olan tepkimenin kinetiğine bağlıdır ki bu da; RH + $ROO^{\cdot}$ hızı yani, uzama hızı ile karşılaştırılmalıdır. Bir bileşiğin bazı radikal türleri ile etkileşebiliyor olması; bu radikal aşağıdaki koşulları sağlamadığı sürece söz konusu bileşiğin bir antioksidan olduğu anlamına gelmemektedir (Valgimigli ve Pratt 2012) (Şekil 1.2.1).

Bu koşullar kısaca;

i) Radikal türü, doğrudan oksitleyici zincir taşımada yer almalıdır, örneğin; peroksil radikali olması,

ii) Reaksiyon, radikal ile korunacak materyal arasında meydana gelen reaksiyonundan çok daha hızlı olmalıdır, örneğin; doymamış lipidler,

iii) Reaksiyon ürünleri zincir reaksiyonlarını yayamayan türler olmalıdır (Valgimigli ve Pratt 2012).

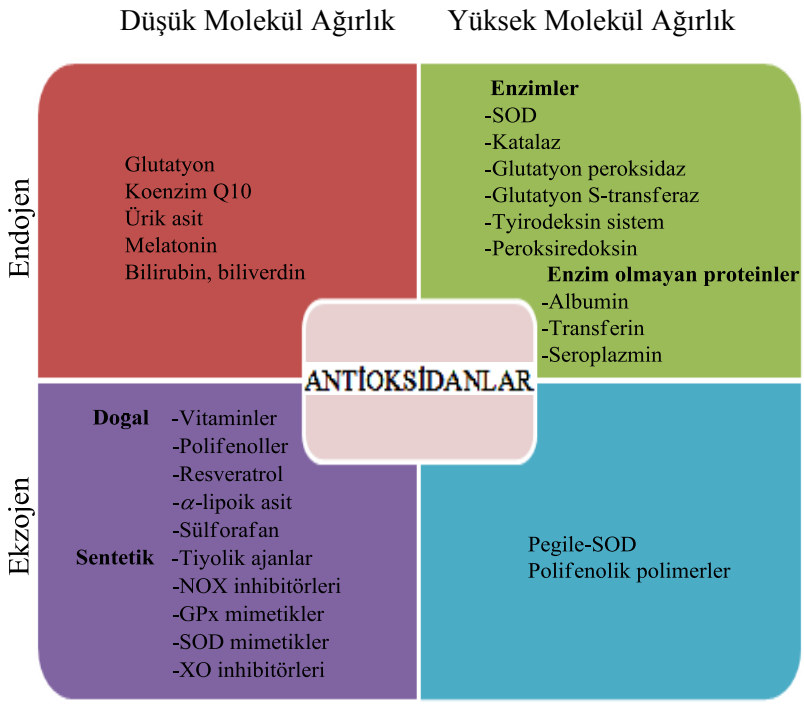
Fenoller prototip zincir kırıcı antioksidanlardır. Genel olarak, hem doğal hem de sentetik fenolik bileşikler peroksil radikallerine karşı yüksek reaktivitelerine bağlı olarak antioksidan gibi davranırlar (Amorati ve ark. 2013).

Bazı bileşikler istenen antioksidan davranışı göstermemektedir (örneğin; gıda ürünlerinde veya model sistemlerdeki lipidlerin korunmasında) bununla birlikte, canlı sistemlerde antioksidan korumayı yükseltirler (örneğin; antioksidan enzimlerin aktivitesini tetikleyerek veya arttırarak). Bu bileşiklere "dolaylı antioksidanlar" denilmektedir, doğal ürünler bunlara uygun örneklerdir (Valgimigli ve Pratt 2012).

Genel olarak, hem doğal (örn.; α-tokoferol) hem de sentetik (örn.; bütillenmiş hidroksi anisol) fenolik bileşikler peroksil radikalleriyle olan yüksek reaktivitelerine bağlı olarak antioksidan gibi davranmaktadırlar (Foti 2007).

1.2.2.2. Endojen ve Ekzojen Antioksidanlar

Antioksidanlar düşük ve yüksek molekül ağırlıklarına göre kategorize edilip, endojen veya ekzojen ajan olarak alt gruplara ayrılabilirler. Ekzojen antioksidanlar doğal veya sentetik olabilmektedir (Saso ve Firuzi 2014). Şekil 1.2.2.2'de insan sağlığı açısından en önemli bazı antioksidanlar ve Tablo 1.2.2.2'de serbest radikal hasarına karşı antioksidanların koruyucu rolü gösterilmektedir.



Şekil 1.2.2.2. En yaygın antioksidanların sınıflandırılması (Saso ve Firuzi 2014)

Tablo 1.2.2.2. Serbest radikal hasarına karşı antioksidanların koruyucu rolü (Ayepola ve ark. 2014)

Antioksidanlar	Hücrede bulunduğu yer	Görevi
Enzimatik antioksidanlar		
Katalaz	Peroksizomlar	H_2O_2'nin su ve oksijene parçalanması
Glutatyon peroksidaz	Sitoplazma, mitokondri ve çekirdek	H_2O_2 ve lipid peroksitlerin parçalanması, GSH oksidasyonu ve GSSG oluşturmak
Glutatyon redüktaz	Sitoplazma, mitokondri ve çekirdek	Kofaktör NADPH kullanarak GSSG'yi tekrar GSH'a dönüştürmek
Süperoksit dismutaz	Sitoplazma, çekirdek, lizozom ve mitokondri	Süperoksit radikalinin H_2O_2'ye dönüştürmek
Enzimatik olmayan antioksidanlar		
GSH	Sitoplazma, mitokondri ve çekirdek	Antioksidan enzimler (GPx, GST) için kofaktör görevi görür, diğer antioksidanları (C vitamini ve E vitamini) aktif formlarına rejenere etmek
E vitamini	Membran	Singlet oksijen, peroksil ve süperoksit radikallerini doğrudan temizler, membran lipidlerini peroksidasyona karşı korumak
C vitamini	Sitozol	E vitamini ile sinerjik etkileşerek radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu sonlandırmak
α-Lipoik asit	Hücre membranı ve sitoplazma	Glutatyon ve C vitamini seviyesini yükseltmek

1.2.3. Antioksidan Aktivite Ölçmede Kullanılan Metotlar

Oksidatif bozunmayı inhibe edebilen bir bileşikte şu iki belirgin parametre aranmaktadır; bir antioksidan molekül tarafından tutulan radikallerin sayısını ifade eden stokiyometrik faktör (aynı zamanda "antioksidan kapasite" olarak bilinir) ve radikaller ile antioksidanlar arasındaki tepkimenin hız sabitine bağlı olan reaktivite. Antioksidan aktiviteyi belirlemede en önemli faktör reaktivitedir. Temelde en iyi antioksidan test; gerçek sistem koşullarında antioksidan bileşiğin oksidasyon üzerine etkilerini ölçebilmelidir. Bununla birlikte, doğal oksidasyon tepkimeleri oda sıcaklığında genelde yavaşlar ve bundan dolayı oksidasyon kinetiği üzerine herhangi kayda değer etkinin gözlemlenebilmesi haftalar hatta bazen aylar alabilir. Birçok durumda inhibe edilmiş sürecin çalışılması pratik olmayabilir (Roginsky ve Lissi 2005, Valgimigli ve Pratt 2012, Amorati ve ark. 2014).

Antioksidan aktivite ölçmede kullanılan metotlar kısaca şunlardır:

Oto-oksidasyon inhibisyonuna dayalı metotlar; oksimetri metodları, hidroperoksitler, TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif türler) yöntemi, uçucu oksidasyon ürünleri ve rancimat (katı ve sıvı yağlarda oksidasyon kararlılığı analizi için bilgisayar kontrollü otomatik analitik cihaz) cihazıdır. Bu metotlar gerçek oto-oksidasyon prosesine çok benzemektedir, antioksidan varlığında veya yokluğunda lipid oksidasyonu oranı ürün oluşumu veya reaktiflerden bir tanesinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Yarışmalı probe bleaching metodları; ORAC (oksijen radikal antioksidan kapasitesi) ve β-karoten ağartma testidir.

İndirek metotlar; DPPH, TEAC (Troloks-ekivalan antioksidan kapasite), FRAP (ferrik indirgeme antioksidan gücü) ve Folin-Ciocalteu testidir (Amorati ve ark. 2014).

1.2.4. Antioksidanların Yetersiz Kaldığı Durumlar

Oksidatif stresle ilişkili hastalıklarda vitamin, polifenolik, flavonoid ve diğer doğal antioksidan kaynaklarının diyetle alınmasının faydaları ile ilgili oldukça fazla epidemiyolojik veri bulunmaktadır. Bunlara rağmen, antioksidanlarla ilgili bazı klinik deneme çalışmaları olumsuz yönde dikkat çekmiştir (Saso ve Firuzi 2014), olası sebepler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

1) **Oksidatif stres gerçekten azaltılamamıştır:** Bu durum, eksik uygulama dozu, tedavinin kısa tutulması veya yanlış zamanlama gibi çeşitli faktörlerden dolayı gelişebilmektedir. Antioksidan terapinin oksidatif stres durumunu gerçekten iyileştirip iyileştirmediğinden emin olabilmek amacı ile bu faktörlerin dikkatlice kontrol edilmesi gerekmektedir (Murphy 2013).

2) **Oksidatif stres hastalığın temel nedeni olmayabilir:** Birçok hastalık temelinde yatan ana neden oksidatif stres değildir. Bir patolojik durumu takiben oksidatif stres oluşabilir (Saso ve Firuzi 2014).

3) **Antioksidan ajan hedef dokuya ulaşamamıştır:** Bazı hastalıklarda antioksidanların yeterli miktarlarının ilgili dokulara ulaştırılması gerekmektedir. Örneğin; nörodejeneratif hastalıklar kan-beyin engelini geçebilen antioksidanlar ile tedavi

edilmelidir. Bazen, mitokondri veya hücre içinde bulunan başka spesifik bir noktaya ulaşmak gerekmektedir (Murphy 2013, Saso ve Firuzi 2014).

4) **Doğru etki mekanizmasına sahip antioksidan kullanılmamıştır:** Antioksidanların etki mekanizmaları farklıdır ve oksidatif stresin bütün koşullarında etkin olmayabilirler. Örneğin; süperoksit radikalinin NO ile tepkimesi sonucu peroksinitrit oluşur, bu reaksiyon vitaminler ve antioksidanlarla olan reaksiyonundan milyar kez hızlıdır (Schramm ve ark. 2012, Saso ve Firuzi 2014).

5) **Antioksidan yeterli değildir:** Fizyolojik koşullar altında, oksidatif stres endojen ve eksojen antioksidanların (lipofilik-hidrifilik, enzimatik-enzimatik olmayan) kompleks bir karışımı tarafından kontrol edilmektedir. Farmakolojik tedavide unutulmamalıdır ki; tek bir antioksidan ajan oksidatif hasarı kontrol altına almada yeterli olmayabilir. Yeterli dozlarda doğru karışımlar kullanılmalıdır (Saso ve Firuzi 2014).

6) **Antioksidan tedavi çok geç başlamıştır:** Antioksidanlar belli koşullar altında, ilerlemiş hastalık evrelerinde başarılı tedavi sağlamamaktadır. Hastalıklara karşı koruyucu rol üstlenebilmelerine karşın, hastalık başladıktan sonra etkili olmayabilirler (Firuzi ve ark. 2011).

7) **Hücre sinyalinde ROT'un fizyolojik fonksiyonları ile girişim:** Antioksidanlar hücre içinde ROT'un normal fizyolojik fonksiyonları ile karışabilir, bu durumda yan etkileri yararlı aktivitelerini maskeler (Kahles ve Brandes 2013). Örneğin, bazı kemoterapi ilaçları veya radyoterapi yüksek seviyede ROT üreterek kanser hücrelerini öldürür, bundan dolayı antioksidan kullanımı bazı kanser tedavilerini engelleyebilir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar antioksidan kullanımının kemoterapide yan etkileri engellediğini ve uzun süreli tedaviyi gerektirdiğini göstermiştir (Seifried ve ark. 2004).

1.3. Kanser, Oluşumu ve Nedenleri

Kanser önemli bir sağlık sorunu olup, dünya genelinde başlıca ölüm nedenlerinden bir tanesidir. Yaklaşık 28.8 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmekle birlikte 2008 yılında 7.6 milyon kişinin ölümüne neden olduğu rapor edilmektedir. Kanserden kaynaklanan ölümlerin sayısı düşük gelirli ülkelerden yüksek gelirli ülkelere göre artmaktadır. Buna rağmen, ekonomisi gelişmiş ülkelerdeki benzer hayat standartlarına ulaştıkça az gelişmiş ülkelerde de kanser hakkında bilinçlenme artmaktadır. Dünya çapında teşhis edilmiş en yaygın kanser türleri akciğer (%12.7), meme (%10.9), kolorektal (%9.7) ve mide (%7.81) kanseridir. Etnik köken, yaş, yaşam tarzı ve beslenme gibi faktörler hastalığın tanımlanmasında ve ilerlemesinde önemli bir etkiye sahiptir. Kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %30'u yüksek vücut kitle indeksi, fiziksel aktivite eksikliği, tütün kullanımı, alkol alımı ve düşük sebze ve meyve tüketimi gibi önde gelen beş davranışsal ve diyet risk faktörlerinden kaynaklanmaktadır (Roleira ve ark. 2015).

Kanser, değişik genetik lezyonlarla tanımlanan çok sayıda farklı hastalıklar olarak tanımlanabilir. Hanahan ve Weinberg (2000) tümöre neden olan özel sebepleri şöyle açıklamaktadırlar;

1) Büyüme sinyallerinde yeterlilik (onkogen ürünlerinin (ras p21, vb) fonksiyonel aktivasyonu),

2) Antibüyüme sinyallerine karşı duyarsızlık (tümör baskılayıcı gen ürünlerinin (p53, vb) fonksiyonel inaktivasyonu),

3) Apoptozis,

4) Sınırsız yenilenme potansiyeli,

5) Uzun süreli anjiyogenez (önceden var olan damarlardan yeni damarların yapımı, filizlenmesi),

6) Doku çoğalması ve metastaz (Ohshima ve ark. 2003).

ROT ve RAT bu süreçlere katılarak kanser gelişmesine katkıda bulunurlar. Bununla birlikte, değişime uğramış hücrelerin yayılmasını kontrol etmek ve bu hücreleri elimine etmeye çalışarak endojen savunmalarda önemli rol alırlar. ROT'nin hem hasar

verici hem de koruyucu özelliklerinin daha iyi anlaşılması sonucu, antioksidan takviyesi alan kanser hastalarının sayısı artmış, buna bağlı olarak tedavide yeni ufukların açılmasına olanak sağlamıştır. Ancak, insanlarda kanseri önleme ve tedavi etmede ROT/RAT'ın etkisinin nasıl olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir (Seifried ve ark. 2007).

1.3.1. Kanserde ROT Dengesi

Bazı araştırmacılar kanser hücrelerinde artan ROT üretiminin disfonksiyonel ROT kaynaklarına veya detoksifiye edicilere bağlı olduğunu bildirmektedir. ROT/RAT düzeylerinin anormal değerlerinin kanser oluşumunda rol aldığına inanılmaktadır. Hidrojen peroksit düzeylerinin tümör hücrelerinde anormal şekilde yükseldiği, diğer hücrelerde ise katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu durumun hidrojen peroksit detoksifikasyonundaki yetersizlikten kaynaklandığı literatürde bildirilmiştir (Szatrowski ve Nathan 1991, Oberley ve Oberley 1997).

Reaktif oksijen türlerinin kanser başlangıcında, gelişmesinde ve metastazında birçok etkisinin olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisi ve önlenmesinde antioksidan kullanımının etkisi klinik çalışmalarda rapor edilmektedir. Hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlamak için ROT seviyesinin düzenlenmesi gerekir. Aşırı antioksidan tüketimi de bu dengeyi bozup istenmeyen etkilerin meydana gelmesine neden olabilir (Seifried ve ark. 2004).

Yüksek organizmalarda hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlardan klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır (Akşit ve Bildik 2008). Nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli olan apoptoz (apoptozis) fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir (Searle ve ark. 1982).

Apoptozun önemi çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilişini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan

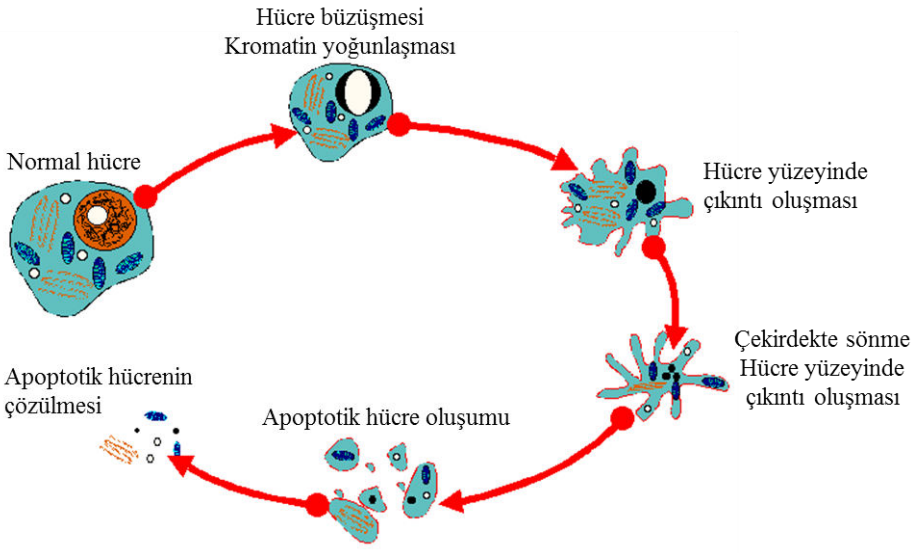
apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patojenlerin temizlenmesi açısından da umut verici bir mekanizmadır (Akşit ve Bildik 2008).

1.4. Apoptoz

1.4.1. Tanımı ve Tarihçesi

Apoptoz (apoptozis), Yunancada apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. Tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücresel süreçtir. Apoptoza direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar. Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücresel yaralanma ve inflamasyon olmaksızın gerçekleştirilir. Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı ve hücre kaybı apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan ifadelerdir. Programlı hücre ölümünün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır (Ulukaya 2015).

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Kerr ve ark. 1972) (Şekil 1.4.1).



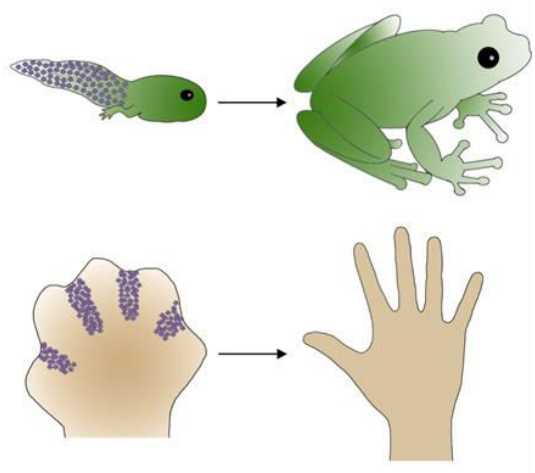
Şekil 1.4.1. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler

1.4.2. Apoptozun Görüldüğü Hücre Çeşitleri

Apoptotik hücreler; organizmanın bazı dokularında sürekli olarak oluşmakta ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Bu dokularda ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halindedir. Apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması ve yerine yenilerinin konması günlük $1x10^{11}$ hücre olarak tahmin edilmektedir. Bu durum, yetişkin bir bireyin total vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir değişimine eşittir (Ulukaya 2015).

Hücrenin yaşam süresi tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Kalp kası hücreleri veya nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır. Ayrıca, dokularda hormona bağlı patolojik atrofi, bazı kalp hastalıkları, otoimmun hastalıklar, nörodejenaratif bozukluklara bağlı hastalıklarda ve kanserde apoptoz mekanizması devreye girmektedir (Zhang ve Xu 2002).

Apoptoz çok hücreli canlıların gelişimi esnasında da görülür. Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerin apoptozla ölmesine bağlıdır. Örneğin, kurbağaların metamorfoz (başkalaşım) esnasında kuyruklarının kaybolarak erişkin forma geçmeleri apoptozla gerçekleşir. İnsan embriyosunda el parmakları arasında bulunan perdelerin buradaki hücrelerin apoptozla ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir (Ulukaya 2015) (Şekil 1.4.2).



Kurbağaların metamorfozisi esnasında kuyrukları kaybolur. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozisle ölerek kaybolurlar.

İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin, buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir.

Şekil 1.4.2. Kurbağa ve insan embriyosunda apoptozis

Apoptozisin bozulduğu durumlar; viral infeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar, organ transplantasyonları, insüline bağımlı tip 1 diyabet, AIDS, malign hastalıklardır.

1.4.3. Apoptoz Morfolojisi

Apoptozda ana morfolojik olay, nukleusun (hücre çekirdeği) yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (Şekil 1.4.1). İmmun elektroforez yapıldığında "ladder pattern" olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300 bin kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Akşit ve Bildik 2008).

Apoptoz tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur (Ulukaya 2015) (Şekil 1.4.1).

1.4.4. Apoptoz Mekanizmaları

Gen aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptoz başlamaktadır. Apoptoz hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), interlökin-2 (IL–2) gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenler önemli yere sahiptir (Ulukaya 2015).

Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar; sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aktive olması, viral bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkogenlerdir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de apoptoz meydana getirirler. Apoptoz bazen dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptoz gelişmesine yol açabilir (Akşit ve Bildik 2008).

1.4.5. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

Hücrede apoptoz ve nekroz gelişimi aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 1.4.5):

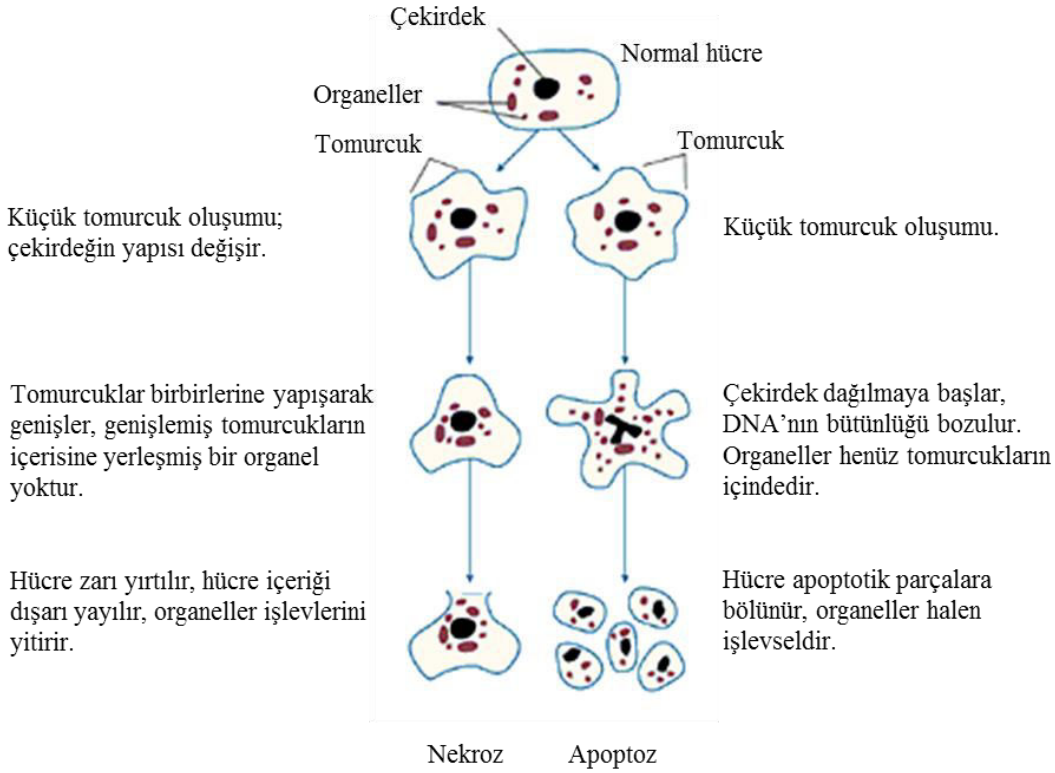
Nekrozda hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür.

Nekrozda kromatin desen hemen hemen normaldir. Apoptotik hücrenin kromatini çekirdek membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozun en önemli özgün yönü DNA'nın internükleosomal bölgelerden parçalanmasıdır.

Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder. Apoptotik hücrenin membranı sağlamdır.

Nekrotik hücre sonradan yıkıma uğrar. Apoptik hücre küçük cisimciklere parçalanır.

Nekrozda inflamasyon uyarılır. Apoptozda inflamasyon oluşmaz (Ulukaya 2015).



Şekil 1.4.5. Hücrede apoptoz ve nekroz gelişimi

1.5. Antioksidan Özellik Gösteren Doğal Bileşikler

Antioksidan olarak kullanılan sentetik bileşiklerin olası toksisiteleri nedeniyle, son yıllarda doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır. Doğal maddelerin önemli antioksidan etki gösterdikleri ve bazen sentetik antioksidanlardan daha etkin olduklarına ilişkin çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay), hayvansal ürünler (peptitler, amino asitler ve karotenoidler), enzimler (glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) ve bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynakları arasında yer almaktadır. Bunların antioksidan özellikleri C vitamini, fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Pokorny ve ark. 2001).

1.5.1. Karotenoidler

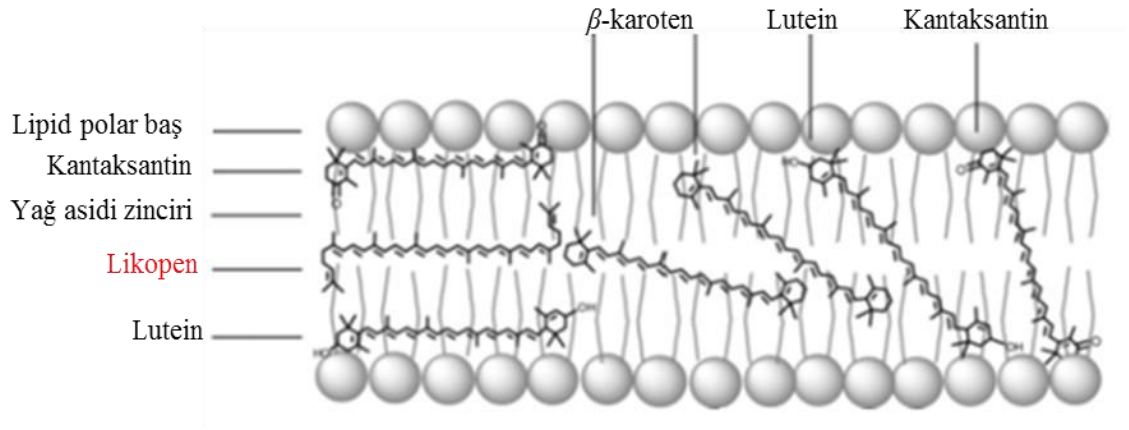
Karotenoidler (Kar) insan diyetinde bolca bulunan doğal pigmentlerdir. Karotenoidlerin insanlar ve hayvanlardaki biyolojik fonksiyonları deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarla araştırılmıştır. Yapılan araştırmalarda karotenoidlerin bazı kanser türleri ile kardiyovasküler ve dejeneratif hastalıkların önlenmesinde olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Canlı organizmalardaki çeşitli fonksiyonları arasında serbest radikal söndürme aktiviteleri ön plana çıkmaktadır. Karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri sahip oldukları elektronca zengin konjuge sistemlerinden kaynaklanmaktadır. Bu konjuge sistemler, hem singlet oksijeni söndürürler hem de radikalleri süpürerek zincir reaksiyonlarını sonlandırırlar. Bu etkilerinden dolayı karotenoidler, gıda ve ilaç sanayinde besinsel destekleyici olarak önem kazanmıştır. Bununla birlikte, yüksek derecede doymamış gruba sahip olmaları karotenoidleri izomerizasyon, oksidasyon ve degredasyona eğilimli hale getirmektedir. Bu nedenle, bu moleküllerin yapısal bütünlük ve fonksiyonunu değiştirebilecek çevresel olumsuz etkenlerden korunması oldukça önemlidir. Diğer taraftan peroksil radikalleri, biyolojik sistemlerdeki yayılma kapasiteleri ve reaksiyonlarının seçiciliğine bağlı olarak diğer birçok radikal türünden daha fazla tehlikeli kabul edilmektedirler. Karotenoidlerin serbest radikal söndürme aktiviteleri ile ilgili aşağıdaki 3 mekanizma kabul edilmektedir (Galano ve Francisco-Marquez 2009, Tan ve ark. 2014):

Elektron transfer (ET) : $R^{\bullet} + Kar \longrightarrow R^{-} + Kar^{\bullet+}$ (1)

Radikal katılma ürünü oluşumu (RKÜ) : $R^{\bullet} + Kar \longrightarrow [R - Kar]^{\bullet}$ (2)

Hidrojen atom transferi (HAT) : $R^{\bullet} + Kar \longrightarrow RH + Kar(-H)^{\bullet}$ (3)

Karotenoid reaksiyonları değişik faktörlere bağlıdır; serbest radikalin türü, karotenoidin yapısal özelliği, biyolojik sistemlerdeki yeri ve membran içindeki lokasyonu sayılabilir. Şekil 1.5.1'de bazı karotenoidlerin yumurta sarısı fosfatidilkolin zarında gösterimi verilmektedir. Karotenoidlerin serbest radikallerle tepkimesinin aynı anda birden fazla yolakla meydana gelebileceği bildirilmektedir (Galano ve Francisco-Marquez 2009).



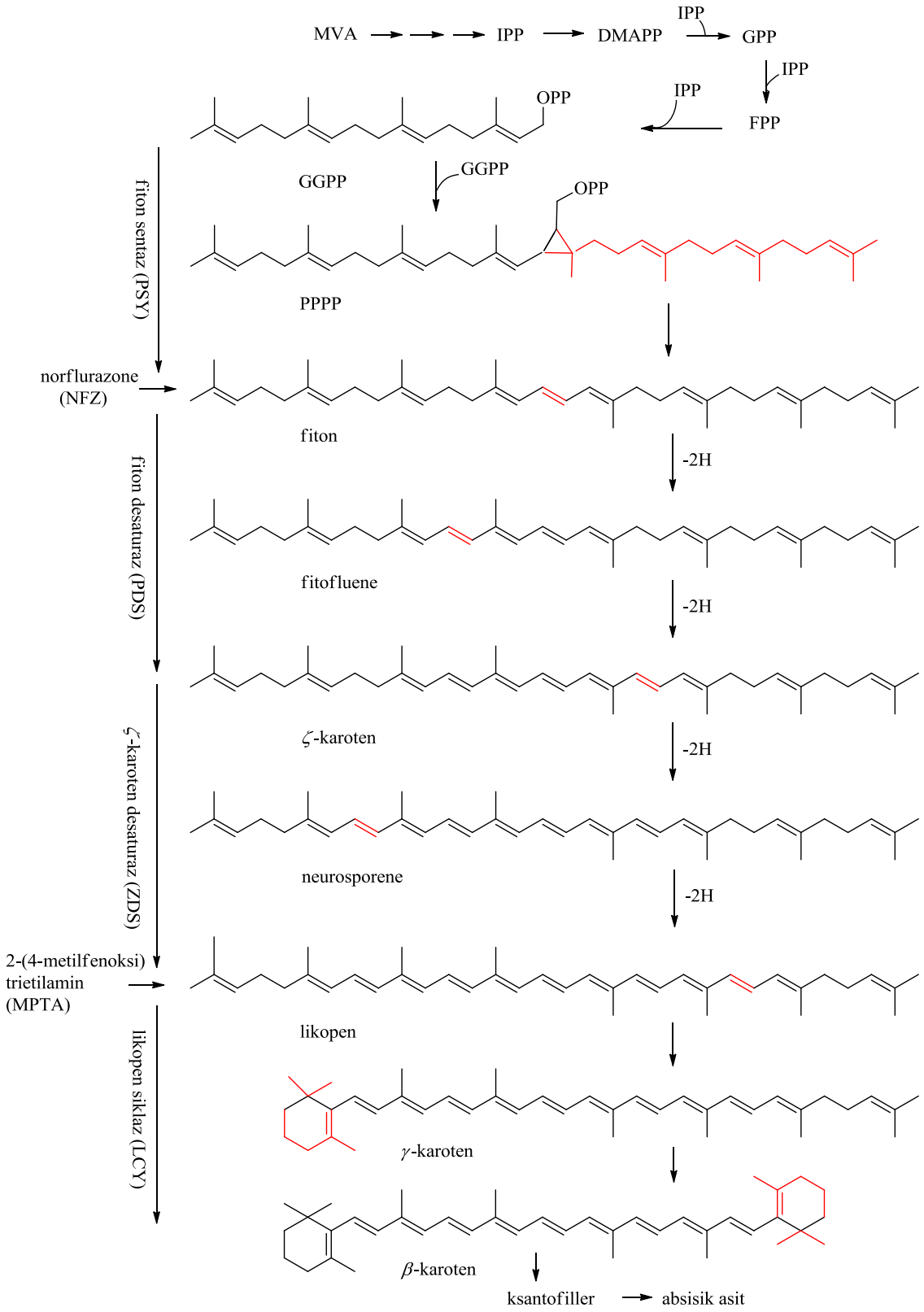
Şekil 1.5.1. Şematik olarak yumurta sarısı fosfatidilkolin (EYPC) zarında bazı karotenoidlerin gösterimi. Likopen, *β*-karoten, lutein ve kantaksantin örnek gösterilmiştir (Tan ve ark. 2014)

1.6. Likopen

Likopen domates, guava, kuşburnu, karpuz ve greyfurt gibi bitkilere parlak kırmızı rengini verir. İnsan vücudundaki en yaygın karotenoitdir. Adını domatesten (*Lycopersicon esculentum*) almaktadır. ROT'a elektron vererek radikalleri söndürme ve nötürleştirme aktivitesi gösteren antioksidanlardandır. Günümüzde yapılan çalışmalarda, KVH ve prostat kanseri riskini düşürdüğü rapor edilmektedir (Hwang ve Bowen 2004). Likopence zengin besinlerle beslenmenin kanserojen moleküllerin likopen tarafından tutulmasını ve hücrelere hasar vermelerini engellediği bildirilmektedir (Jetawattana 2005).

1.6.1. Likopen Oluşum Yolları

Karotenoidler, 40-karbon atomlu polien zinciri ve bazısının sonunda halka bulunan geniş bir sınıfı kapsamaktadır. Likopen oluşumu kısaca şöyle açıklanabilir; birinci basamakta, geranilgeranil pirofosfat sentaz enzimi (GGPS) ardışık üç tane kondenzasyon tepkimesini katalizler. Bu tepkimelerden ilki, izopentenil pirofosfat (IPP) ve dimetilalil pirofosfat (DMAPP) moleküllerinin geranilgeranil pirofosfat (GGPP) oluşturduğu tepkimedir. Karotenoidlerin sentezi iki adet GGPP molekülünün iki basamaklı dönüşüm tepkimeleri ile fiton difosfat (fiton pirofosfat, PPPP) oluşturması ve daha sonra fiton sentaz (PSY) katalizörlüğünde fitonun meydana gelmesi ile başlar. Fiton karotenoid yolağındaki (pathway) ilk lipofilik bileşiktir. Fitonun ardışık doymamış bağ oluşturma reaksiyonları sonucu sırasıyla; fitofluene (phytofluene), ζ-karoten, neurosporene ve likopen sentezlenir. Likopen siklaz enzimi (LYC) likopeni β-karotene dönüştürür, bu da hayvanlarda A vitaminine parçalanmaktadır. Bazı çift bağları okside olan karotenoidlere ksantofiller, okside olmayan karotenoidlere ise karotenler denilmektedir (Şekil 1.6.1) (Cunningham ve ark. 1994).



Şekil 1.6.1. Siyanobakteri ve bitkilerde karotenoid biyosentez mekanizması (Cunningham ve ark. 1994)

1.6.2. Likopenin Biyolojik Özellikleri

Likopen fotosentetik organizmalarda ışık toplayıcı pigment işlevi görmekte olup bu organizmaları ışık ve oksijenin zararlı etkilerinden korur. Fotosentetik olmayan organizmalarda ise oksidasyon önleyici mekanizmalarda rol almaktadır (Tuveson ve ark. 1988, Jetawattana 2005). Hayvanlar karotenoid sentezleyemedikleri için diyetleri ile almak zorundadırlar. Doğada bilinmekte olan 600 karotenoid arasından sadece 20 tanesi insan plazma ve dokularında bulunmaktadır. Likopen, insan kan ve dokularında bulunan ana karotenoid olup öncelikle testis, böbreküstü bezleri, karaciğer, prostat, meme, kalın bağırsak ve akciğerlerde bulunmaktadır. Yarılanma ömrü yaklaşık 2-3 gündür ve lipoproteinler (LDL, VLDL) aracılığı ile plazmada taşınmaktadır. Ara bağlantılar (Gap Junction Connections; GJC) besin maddeleri ve sinyal molekülleri gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin alışverişinde hücreleri bağlamaya olanak sağlayan hücreden hücreye kanallardır. Kanser oluşumunun bir özelliği GJC kaybıdır. Likopen hücreler arasında GJC arttırır ve konneksin (ara bağlantı oluşturan iç zar proteinlerine verilen ad) 43 gen ekspresyonunu arttırır. Koneksin 43 geni ana GJC proteinini kodlar, dolayısıyla; GJC regülasyonunu arttırır ve antikarsinojen gibi davranır (Tapiero ve ark. 2004, Jetawattana 2005).

Günümüzde likopen kullanımının yan etkisini rapor eden literatür bulunmamaktadır. Likopen yağda çözünen bir antioksidan olduğu için, probukol ve kolestiramin gibi kolesterol düşürücü ilaçlarla beraber alınımında gastrointestinal emilim azalmaktadır. Buna bağlı olarak, likopenin serum konsantrasyonunun önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (Jetawattana 2005).

Likopenin ideal alım dozu halen bilinmemekle birlikte yapılan bir çalışmada, likopen emilimi için bir yemek porsiyonunda en az 5-10 g yağa ihtiyaç duyulduğu ve prostat kanserinin önlenmesi için 6 mg/gün likopenin faydalı olduğu rapor edilmektedir (Elinder ve ark. 1995).

Son zamanlarda, likopenin meme, prostat, akciğer ve endometrium gibi birçok kanser türünün çoğalmasını engellediği bulunmuştur. Likopenin hücre döngüsü tutuklamasını (cell cycle arrest) başlattığı ve insan prostat kanser hücrelerinde (LNCaP) apoptoza neden olduğu rapor edilmektedir. Prostat hücrelerine etki eden mekanizma

henüz bilinmemektedir. En yaygın kabul gören teori likopenin $^1O_2$ söndürme etkisidir. Likopen bu nedenle, özellikle koroner kalp hastalığı ve prostat kanseri gibi bazı hastalıklarda potansiyel koruyucu ve tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (Everson ve McQueen 2004, Hwang ve Bowen 2004, Jetawattana 2005).

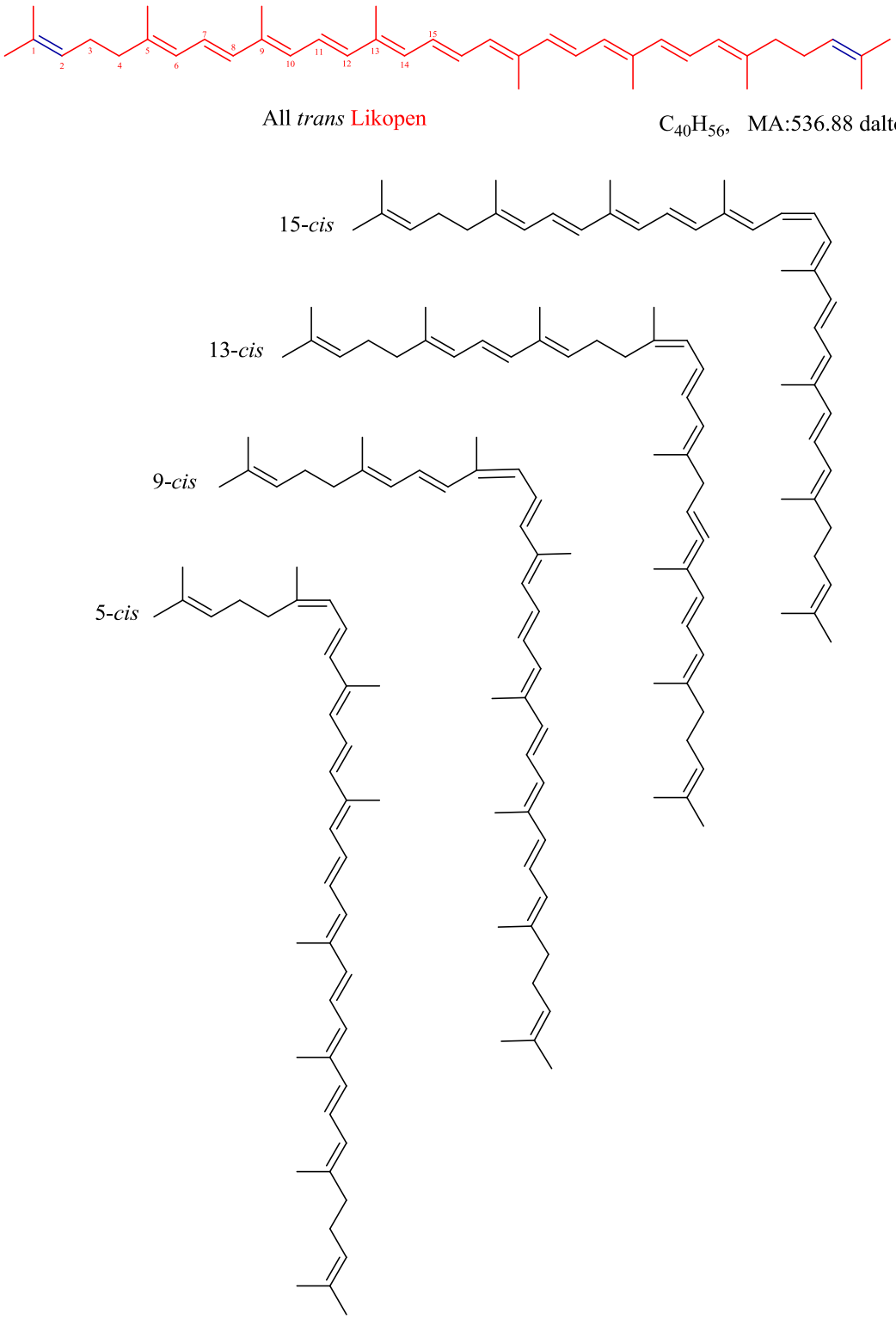
1.6.3. Likopenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Likopen ilk 1910'da izole edilmiş ve 1931'de molekül yapısı belirlenmiştir. Kırmızı likopen pigmenti 40 karbon, 56 hidrojen atomundan ($C_{40}H_{56}$, molekül ağırlığı 536.88 dalton) ve 8 izopren biriminden oluşan simetrik bir tetraterpendir. Likopen 11 konjuge ve 2 konjuge olmayan çift bağ içerir. Kimyasal reaksiyonlarda yüksek veya düşük enerjide bu bağlar *trans* formundan mono veya poli *cis* izomerizasyonuna maruz kalabilir. Likopen genellikle all-*trans* ve 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* ve 15-*cis* izomeri formunda bulunur (Şekil 1.6.3). Likopenin kimyasal adı aynı zamanda *psi*-karoten olarak da bilinmektedir (Jetawattana 2005, Sabbağ ve Sürücüoğlu 2011).

Likopen hekzan, benzen, kloroform ve diklorometan gibi organik çözücülerde çözünmekte ancak metanol, etanol ve suda çözünmemektedir. Bitki matriksinde veya katı halde iken kararlı olan likopen, matriksten ekstraksiyon sonrasında ve nonpolar organik çözücüde kararlı değildir. Bu nedenle, *in vivo* ve *in vitro* deneylerde likopen içeren preparatların kararlılık durumunun göz önünde bulundurulmaları gerekmektedir (Hekimoğlu 2010).

Likopen doğal lipofilik karakterde olduğundan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) yapılarında bulunur, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin yapılarında (HDL) bulunmaz (Sabbağ ve Sürücüoğlu 2011).

Karotenoidlerin bilinen en iyi özelliği görünür spektrum bölgesi olan 400-500 nm'de (mavi bölge) ışığı absorblamalarıdır. Bu fiziksel özellik, pigmentlere karakteristik kırmızı/sarı rengini kazandırır. Buna ilaveten, uygun bir triplet hal doygunlaştırıcıdan (^{3}sen) enerji transferi ile uyarılır veya singlet oksijenden ($^1O_2$) uyarma enerjisi transferi sonucu triplet karotenoid (^{3}karotenoid) türleri meydana gelmektedir. Yeterli sayıdaki konjuge çift bağa bağlı olarak $^1O_2$ söndürülmektedir (Jetawattana 2005).



Şekil 1.6.3. Likopenin all-*trans* ve *cis* izomerik formları (Hernandez-Marin ve ark. 2013)

Likopenin içerdiği konjuge çift bağlar antioksidan özelliğinden sorumludur. Likopen okside olduğunda, karbon atomları arasındaki çift bağlar kırılır, her biri bir oksijen atomuna çift bağlı olan daha küçük moleküllere parçalanır. C=O bağı kromoforik olmasına rağmen, daha kısa moleküller renkli görünecek kadar yeterli ışığı absorblayamazlar. Likopen indirgendiğinde buna benzer etki meydana gelmektedir, indirgenme likopen moleküllerini doygunlaştırır ve birleştirir, sonuç olarak çift bağlar tek bağa dönüşür. Bu reaktivite likopenin biyolojik sistemlerdeki antioksidan aktivitesinin temelini oluşturmaktadır. Buna ilaveten, çift bağlardan herhangi birinin rotasyonu *cis*-geometrik izomerlerin oluşmasına olanak sağlar. Doğada bulunan likopenin büyük kısmı all-*trans* formda bulunmaktadır. Işık veya ısıya maruziyet veya kimyasal reaksiyonlar izomerizasyon sonucu çeşitli mono- veya *cis*- izomer üretimine neden olmaktadır. Diğer taraftan, insan vücudundaki likopenin büyük kısmı *cis*-izomerdir. Bu durum, *cis* izomerlerin daha uygun şekilde emildiği hipotezini güçlendirmektedir (Krinsky ve Yeum 2003, Jetawattana 2005, Hekimoğlu 2010).

Likopence zengin besinler, pişirme işleminden geçirildiğinde besin matriksindeki makromoleküllere sıkıca bağlı olan likopen protein bileşiklerinden serbestlenir, bu durum biyoyararlanımı arttırır (domates gibi). Ayrıca, yağla birlikte tüketilen likopenin biyoyararlanımı artar. Besinlerle alınan likopen ince bağırsaktaki lipid miselleri içine geçer, bağırsaktaki besinsel lipidler (triasilgliserol, kolesterol ve yağ asidleri) likopenin çözünmesine ve pasif transport ile bağırsak mukoza hücrelerine geçmesine yardımcı olur. Şilomikronlara geçen likopen lenfatik sistem aracılığı ile bağırsak mukozasından sistemik dolaşıma katılır. Likopenin karaciğer metabolizması günümüzde henüz tam olarak açıklanamamıştır (Hekimoğlu 2010).

1.6.4. Likopenin Radikal Türleri ile Tepkimeleri

Likopen radikallerle farklı yollardan tepkimeye girebilmektedir. All-*trans* likopen $O_2^{\cdot-}$ veya $NO_2^{\cdot}$ ile elektron transfer yoluyla tepkimeye girer (Tepkime 4 ve 5) ve hız sabiti 1.9 x 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ olan radikal katyon oluşur (Jetawattana 2005).

$$\text{Likopen} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{Likopen}^{\bullet-} + O_2 \qquad (4)$$

$$\text{Likopen} + NO_2^{\bullet} \longrightarrow \text{Likopen}^{\bullet+} + NO_2^{-} \qquad (5)$$

Likopenin en etkili $^1O_2$ söndürücü biyolojik karotenoid olduğu rapor edilmektedir. Bir molekül likopen indirgenmeden önce binlerce singlet oksijen molekülünü bağlayabilir. Diğer karotenoidlerle karşılaştırılınca, en yüksek fiziksel radikal söndürme hız sabitine (k_q) sahiptir ($^1O_2 = 3.1 \times 10^{10}\ M^{-1}s^{-1}$) (Jetawattana 2005).

Likopenin aynı zamanda, alkil tiyol radikali ($RS^{\cdot}$), glutatyon tiyol radikali ($GS^{\cdot}$) ve tiyol sulfonil radikali ($RSO_2^{\cdot}$) ile çok hızlı bir şekilde tepkimeye girdiği rapor edilmektedir (Tepkime 6-8). Bu radikallerle tepkime hız sabitleri sırasıyla şöyledir; $1.6 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$, $4.8 \times 10^8\ M^{-1}s^{-1}$ ve $1.26 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$ (Jetawattana 2005).

$$RS^{\cdot} + \text{likopen} \longrightarrow [RS\text{-likopen}]^{\cdot} \quad (6)$$

$$GS^{\cdot} + \text{likopen} \longrightarrow [GS\text{-likopen}]^{\cdot} \quad (7)$$

$$RSO_2^{\cdot} + \text{likopen} \longrightarrow [RSO_2\text{-likopen}]^{\cdot} \longrightarrow RSO_2^{-} + \text{likopen}^{\cdot +} \quad (8)$$

$NO^{\cdot}$ süpürme mekanizmasının tersine, $RS^{\cdot}$ ve $GS^{\cdot}$ radikal ekleme işlemi aracılığı ile tepkimeye girer, elektronca zengin likopen molekülüne eklenir, likopen zincirinde ortaklanmamış bir elektrona sahip radikal-likopen katılma ürünü meydana gelir. $RSO_2^{\cdot}$ radikali ise hem radikal ekleme ile bir radikal olan likopen katılma ürününü oluşturur, hem de elektron alarak likopen katyon radikalini oluşturur. Hem likopen katılma ürünü radikali hem de likopen radikal katyonu biyomoleküler olarak parçalanmaktadır (Jetawattana 2005).

Likopen radikal katyonunun tokoferol (TOH) ile tepkimesinde indirgenerek tokoferoksil ($TO^{\cdot}$) radikalini oluşturduğu tespit edilmiştir (Tepkime 9) (Jetawattana 2005).

$$\text{Likopen}^{\cdot +} + TOH \longrightarrow \text{Likopen} + TO^{\cdot} + H^{+} \quad (9)$$

1.6.5. Kanserde Likopenin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

Likopenin hücre döngüsü tutuklama ve apoptozisi indükleme mekanizması henüz tam anlaşılamamıştır. Likopen, hücre döngü ilerlemesini ve hücre çoğalmasını değiştirerek kanserin gelişimini olumsuz etkilemektedir. Likopen; DNA sentezi üzerinde engelleyici etki gösterir, ara bağlantı proteinlerinin artışını başlatır, bölgesel

androjen sinyalini düşürür, insülin benzeri büyüme faktörü (IGIF-1) sinyalini etkiler ve bunları takiben antioksidan aktivite ve apoptotik hücre ölümünü başlatır. Likopen prostat ve meme kanser hücre hatları üzerinde hücre büyümesini engelleyici etkiye sahiptir. Meme kanseri modellerinde, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin düşük sentezlenmesi, örneğin siklin D1 ve E, sikline bağımlı kinazlar 2 ve 4, bunlara ilaveten IGF-I aktivitesinin durdurulması likopenin çoğalma (proliferasyon) üzerine etkileriyle ilişkilendirilmektedir. Her ne kadar likopenin prostat kanserinin önlenmesindeki rolü daha kapsamlı olarak çalışılsa da, diğer organları etkileyen kanser türleriyle ilgili insan çalışmaları da günümüzde yürütülmektedir (Teodoro ve ark. 2012).

Güçlü bir antioksidan olmakla birlikte bir dizi diğer mekanizma da likopenin kanser riskini azalttığını önermektedir (Teodoro ve ark. 2012).

Düzensiz hücre döngüsü kanser hücrelerinin en önemli ayırıcı özelliklerinden bir tanesidir. Bu hücreler, hücre döngüsünü düzenleme ve çoğalma hızını kontrol etme yeteneğini kaybederler. Hücre döngüsünde hız sınırlayıcı bir basamak olan G1 fazı aracılığıyla hücrelerin devamlılığı kanserde sık sık bozulmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, likopenin G1 fazında hücre döngü tutuklamasını indükleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca, likopenin G0/G1 tutuklamasını ve S fazını durdurmayı indüklediği bulunmuştur (Teodoro ve ark. 2012).

Likopen çeşitli bitki, alg ve diğer fotosentetik organizmalarda bulunan asiklik bir non-provitamin A karotendir ve β-karoten dahil çeşitli karotenoid biyosentezinde önemli bir aracıdır. Provitamin A aktivitesinin bulunmaması likopenin biyokimyasını α-karoten, β-karoten ve kriptoksantin gibi diğer karotenoidlerden ayırır (Hekimoğlu 2010). Diyetimizde bulunan likopenin %80'ni domates içermektedir, %20 ise karpuz ve diğer sebze meyveler ile alglerde bulunmaktadır (Friedman 2013).

1.7. Karpuz

1.7.1. Botanik Sınıflandırma

Botanik isim : *Citrullus lanatus* (Thunb)

Sınıf : Equisetopsida

Alem : Bitkiler alemi

Cins : *Citrullus*

Çeşit : *Lanatus*

Aile : Kabakgiller (*Cucurbitaceae*)

Takım : *Cucurbitales* (Deshmukh ve ark. 2015)

1.7.2. Yöresel Adlandırma

C. lanatus bazı ülkelerde; karpuz (Türkiye), tarbooz (Hindistan), tormuz (Bengal), wassemelone (Doğu Almanya), wassermelone (İsviçre), waatlemoen (Afrika), karpusi (Yunanistan), battikh ahmar (Arabistan), vandmelon (Danimarka), tarbuz (İran), sandia (İspanya) şeklinde adlandırılır (Rahman ve ark. 2013).

1.7.3. Morfolojik Özellikleri

C. lanatus kıvırcık filizleri ve uzun (10 metreye kadar) gövdesiyle toprak üzerinde uzanan veya sürünen yıllık otsu bir asmadır. Yaprakları 5-20 ile 3-19 cm, tüylü, genellikle 3-5 lobdan oluşmuş derin elsi şekildedir. Yaprak sapları 2-19 cm uzunluğundadır. Erkek çiçekler 1.2-4.5 cm uzunluğunda çiçek sapları üzerindedir. Çiçekler 1-2.5 cm uzunluğunda, sarı yeşil renkte, bir evciklidir. Yabani bitkilerin meyve çapı 1.5-20 cm, meyveler küresel yapıya benzer, yeşilimsi ve koyu yeşil beneklidir. Kültür bitkilerinin meyve çapı 30 x 60 cm, meyveler küresel veya elips, yeşil veya sarımsı renkte, renkli ya da çeşitli biçimlerde benekli veya çizgilidir. Meyveler renk, koku ve tat gibi özellikleriyle farklılıklar gösterirler (Dane ve Liu 2007).

Karpuz toprak pH'sının nötr olmasını ister. Ancak, yapılan araştırmalarla karpuz için en elverişli toprak reaksiyonunun pH 5.0-6.5 olduğu tespit edilmiştir.

Karpuz, ılıman iklimlerden hoşlanır, kumlu-killi, derin ve serin toprakları sever. Özellikle nehir ve göl kenarları karpuz yetiştiriciliğine elverişlidir. Gübreyi çok sever. Çiftlik veya kuş gübresi verimi artırmada iyidir. İlkbaharda don ve kırağı tehlikesi geçtikten sonra ekilir.

1.7.4. Karpuz Tarihçesi

Karpuzun Güney Afrika kökenli olduğu düşünülmektedir, yabani olarak tatlı, tatsız ve acı formları yetişmekte olup, maksimum genetik çeşitliğe bu bölgede ulaştığı gözlenmektedir. *Citrullus colocynthis* genellikle karpuzun yabani atası olarak bilinmesine rağmen, günümüzde Kuzey ve Batı Afrika'da yerli tür olarak yetişmektedir. Dane ve Liu (2007) karpuz kloroplast DNA (ctDNA)'sı üzerine yaptıkları araştırmada kültür ve yabani karpuzların birbirinden bağımsız olarak ortak atadan türediklerini tespit etmişlerdir.

Günümüzde Çin, dünyanın en büyük tek karpuz üreticisi olmasının yanında milattan önce 10. yüzyılda da burada karpuz yetiştirildiği belirtilmektedir. Karpuz, Orta Afrika'dan dünyaya yayılmıştır. Buradan önce yakın çevre olan Anadolu ve İran'a geçmiştir, daha sonra Asya'ya yayılmıştır. 13. yüzyıla gelindiğinde, Faslılar Avrupa'yı bu meyveyle tanıştırmışlardır (Rahman ve ark. 2013).

1.7.5. Habitat ve Ekonomik Değeri

Karpuz; kavun, salatalık ve kabak ile birlikte kabakgiller ailesinin meyve olan bir üyesidir. Kabak ve kavun bitkilerinin kabuk kısmı sebze olarak değerlendirildiği halde, karpuz bitkisinde değerlendirilen kısım kabuğun altındadır. Kabak ve kavunların çekirdek evlerinde az veya çok boşluk oluşur. Karpuzlarda ise boşluk meydana gelmez. Karpuz Afrika, Orta Asya ve Akdeniz'in ılıman bölgelerinde yetişmektedir (Rahman ve ark. 2013).

Karpuzlar renk, şekil ve yetiştiği yere göre isim alırlar; Yeni dünya karpuzu, Alacalı karpuz, Kara karpuz (kara buz karpuzu), Gülle karpuzu, Washington karpuzu ve Diyarbakır karpuzu.

Günümüzde, dünya çapında sebze üretimi için ayrılan alanın %6.8'ni karpuz kaplamaktadır. 2008 yılında, karpuz yetiştiren ilk 20 ülkenin geliri 8.6 milyar doları bulmuş ve 89 milyon ton meyve üretilmiştir (Guo ve ark. 2013).

Türkiye 135-150 bin hektar alan üzerinde yaklaşık 4 milyon ton (3 887 324 ton, TUİK 2013) karpuz üretimi ile Çin'den (70 000 000 ton, 2012) sonra dünyanın ikinci büyük karpuz üreticisidir. Ülkemizde sebze üretim miktarları dikkate alındığında karpuz, domatesten (11 820 000 ton, TUİK 2013) sonra en fazla üretilen sebzeler arasında yer alır. Karpuz üretimi genellikle geniş alanlarda turfanda veya tarla sebzeciliği şeklinde yapılır.

1.7.6. Kimyasal Bileşenleri

Karpuz dünya genelinde tüketicinin diyetinde önemli yer kaplamaktadır. Meyvesi yaz sezonunda tüketilir, serinletici etki gösterir ve susuzluğu giderir (Rahman ve ark. 2013). Karpuz büyük oranda (%90 üzeri) sudan oluşmakla birlikte şeker ile sitrulin, arjinin ve glutatyon amino asitlerini içermektedir. Sitrulin amino asidi ilk defa karpuzdan ekstrakte edilmiştir. Likopenin yanı sıra içeriğinde fitofluen, fiton, β-karoten, lutein ve neurosporene karotenoidleri bulunmaktadır (Collins ve ark. 2007). Mükemmel A, B ve C vitamini kaynağıdır. Bunlara ilaveten, kalsiyum, potasyum, fosfor, magnezyum ve sodyum elementlerini içermektedir (El-Adawy ve ark. 2001).

Karpuz çekirdekleri yaklaşık %35 protein, %50 yağ ve %5 liften oluşmaktadır. Bundan dolayı, protein (esansiyel ve esansiyel olmayan) ve yağ bakımından mükemmel kaynaklardır. Bunların yanında, magnezyum, kalsiyum, potasyum, demir, fosfor ve çinko gibi mikro ve makro besin maddelerince zengindir (Rahman ve ark. 2013). Karpuz çekirdekleri aynı zamanda alkaloidler, flavanoidler, tanninler, amino asitler, karbohidrat, kardiyoglikozit, terpenoid, steroid ve karotenoid içermektedir (Deshmukh ve ark. 2015).

1.7.7. Karpuzun Farmakolojik Aktiviteleri

Karpuzun antibakteriyel, antifungal, antimikrobiyal, antiülseratif, antioksidan, ağrı kesici, anti-inflamatuvar, antihepatotoksik ve antigiyardial aktivite gösterdiği, mide koruyucu, ateroskleroza karşı koruyucu, prostat hiperplazisine karşı koruyucu ve laksatif etkisi olduğu ayrıca, toksisite açısından güvenilirliği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Deshmukh ve ark. 2015).

1.8. Arsenik

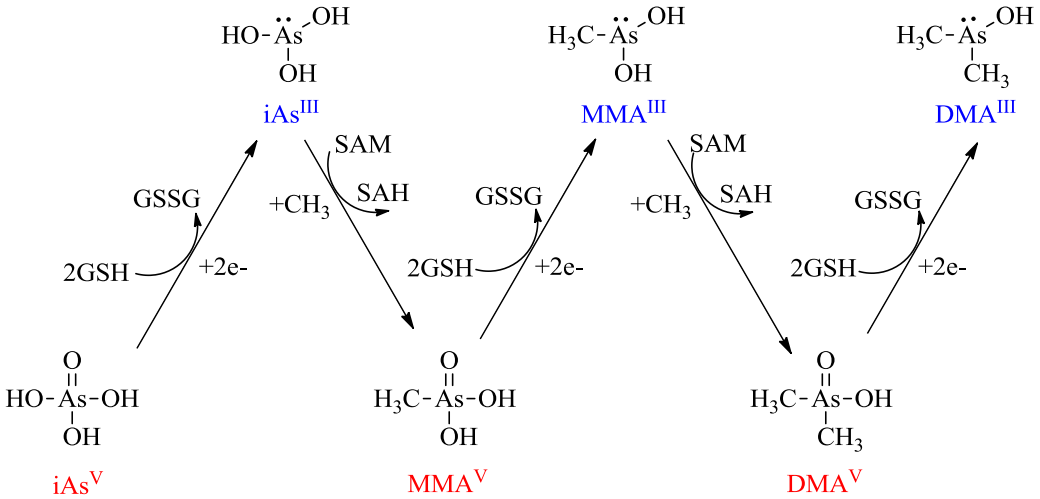
Arsenik (As) renksiz kokusuz ve tatsız bir maddedir. Yeryüzünde 20, deniz suyunda 14 ve insan vücudunda 12'nci en yaygın olarak bulunan elementtir. Bir metaloid (yarı metal) olan arseniğin atom numarası 33, atom ağırlığı 74.92'dır. Periyodik cetvelin 5A gurubunda, fosfor (P) ile antimon (Sb) arasında olup, ikisinin arasında özellikler gösterir. Yazılı belgelere göre, 1250 yılında arseniği ilk kez serbest element halinde tanımlayan Albertus Magnus As_2S_3 (realgar) ısıtarak arsenik elde etmiştir (Mandal ve Suzuki 2002, Mohan ve Pittman 2007).

Arsenik doğada farklı (-3, 0, +3 ve +5) oksidasyon basamaklarında, hem organik hem de anorganik bileşikler şekilde bulunmaktadır. Arseniğin en yaygın formları suda çözünebilen arsenit ve arsenattır. Arsenat (As^{5+}) türleri ortamın pH'ına göre H_3AsO_4 (arsenik asit), $H_2AsO_4^-$ ve $HAsO_4^{2-}$; arsenit (As^{3+}) ise H_3AsO_3 (arsenöz asit), $H_2AsO_3^-$ ve $HAsO_3^{2-}$ formunda bulunmaktadır. Oksijence zengin, aerobik ortamlarda As^{5+} türleri baskın ve kararlı iken, indirgen anaerobik koşullarda ise As^{3+} türleri baskındır. Çünkü As^{3+}, ortamda bulunan oksijeni kullanarak As^{5+} dönüşür. pH ve redoks potansiyeli, arsenik türünü kontrol eden en önemli parametrelerdir (Smedley ve Kinniburgh 2002, Yousef ve ark. 2008, Pan ve ark. 2011).

İnorganik arsenik ürünleri ilk çağlardan beri bilinmektedir. Antik Yunan ve Roma'da As_2S_2 (realgar-kırmızı zırnık) ve As_2S_3 (orpiment-sarı zırnık) gibi arsenikli bazı bileşikler tüy dökücü, makyaj malzemesi, tedavi edici ve zehirleyici ajan olarak değerlendirilmiştir. Orta Çağ ve Rönesans döneminde frengi (penisilin keşfinden önce arsepamine ve salvarsan), uyku hastalığı ve akut promyelositik lösemi tedavisinde bazı organik arsenik bileşikleri kullanılmıştır. Günümüzde ise, hematolojik malignite tedavisinde arsenik trioksit kullanımı artmıştır. Bunun etkinliliği insan glioma hücreleri

ve bazı fare tümör hücreleri üzerinde *in vitro* olarak test edilmiştir (Kanzawa ve ark. 2003). Arseniği tespit eden ilk hassas metot 1836'da Marsh tarafından keşfedilmiştir (Rodriguez ve ark. 2003).

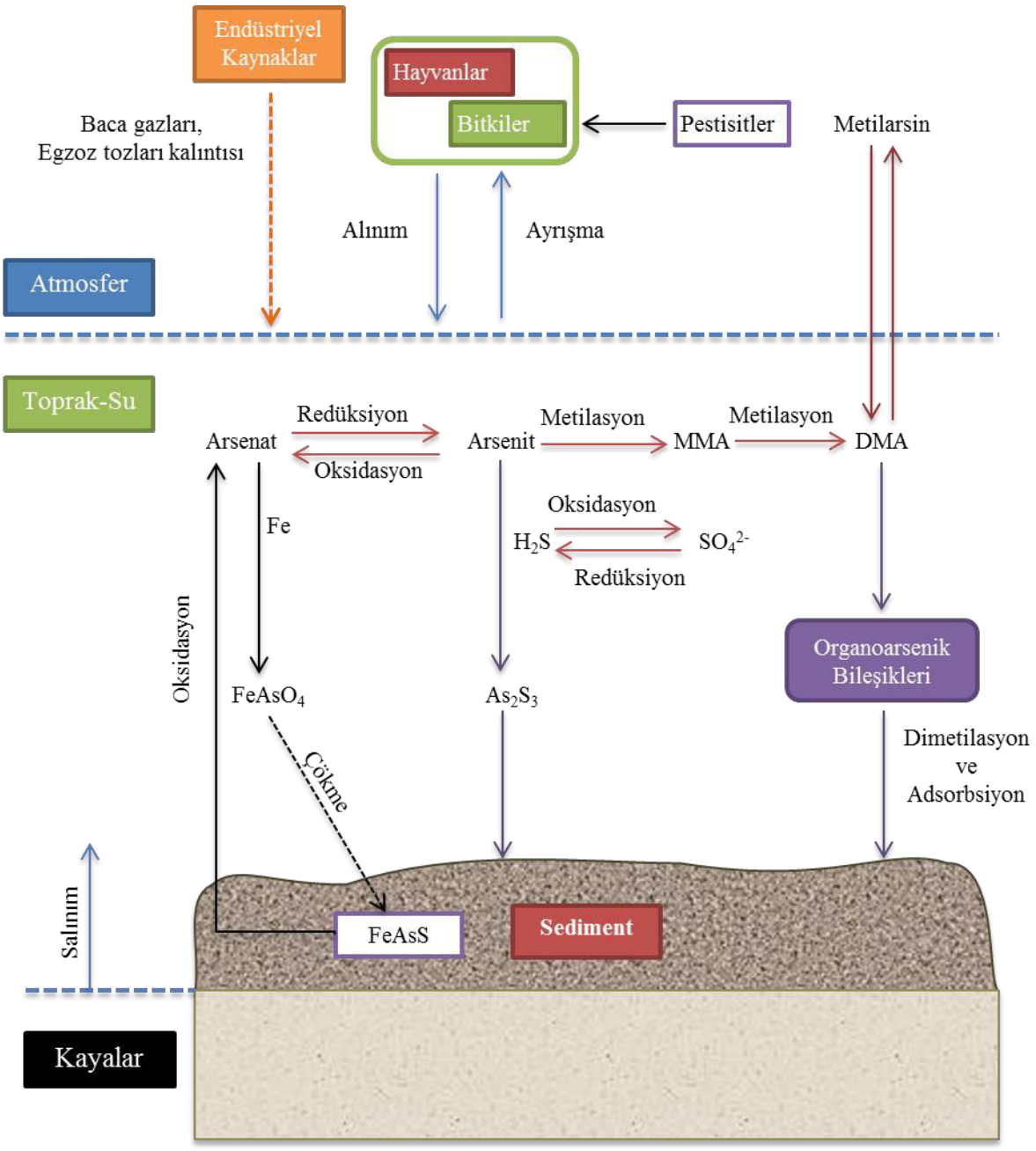
Arsenit fonksiyonel enzimlerin kritik olan tiyol gruplarına bağlanabilme özelliğine sahiptir. İnorganik arsenik solunum yolu veya sindirim sistemine alınır alınmaz, bir seri enzim-katalizli ardışık indirgeme ve metilasyon basamakları aracılığı ile organik arsenikli bileşiklere dönüştürülmektedir (Zakharyan ve ark. 2001) (Şekil 1.8.1).



Şekil 1.8.1. İnsanlarda arseniğin biyometilasyonu. İndirgeme basamaklarına GSH aracılık etmektedir, oksidatif metilasyon basamakları S-adenozil metiyonin (SAM) tarafından katalize edilir. SAM metil donörü olarak dimetillenmiş S-adenozil-L-homosistein (SAH) üretir (Zakharyan ve ark. 2001, Brima ve ark. 2006)

Arsenik tabiatta var olan bir metal olup, gıda, toprak ve suda bulunur, doğal ve yapay kaynaklardan çevreye salıverilir (Yousef ve ark. 2008, Pan ve ark. 2011). Şekil 1.8.2'de doğada arsenik döngüsü şematik olarak gösterilmektedir. Arsenik topraktaki kayaçlardan, minerallerden, maden filizlerinden aşınarak ve çözünerek doğal yollardan su ortamına geçer. Ayrıca, arsenik ve diğer elementlerin (kurşun, krom, civa) biyosferdeki varlığı insan faaliyetlerine de bağlıdır. Madencilik atıkları, mineral kırıntılar, cam üretimi, bilgisayar çipleri, ahşap koruyucular, böcek öldürücüler, kemirgen öldürücüler, ot öldürücüler ve bazı tarım ilaçları gibi çeşitli insan kaynaklı (antropojenik) faaliyetler sonucu da ortama salınmaktadır (Smedley ve Kinniburgh 2002, Kanzawa ve ark. 2003, Choong ve ark. 2007). Atmosfere yayılan sanayi metalik

emisyonlarının yaşam süreleri birkaç gün gibi kısadır, fakat bunlar emisyon noktalarından uzak mesafelere taşınır, karada birikir, göl ile nehirlerde tortu oluşturabilir. Bu koşullarda metallerin yaşam süreleri birkaç yüzyıldan birkaç bin yıla kadar çıkabilmektedir (Ayres 1992, Al Rmallia ve ark. 2005).



Şekil 1.8.2. Doğada arsenik döngüsü (Roy ve Saha 2002, Al Rmallia ve ark. 2005, Brima ve ark. 2006)

Ortalama seviyeden daha yüksek arseniğe temas ya işyerlerinde (örneğin döküm sanayinde, kömür santralinde, kozmetik sanayinde, tarımda vb.) veya arsenikle kirlenmiş gıda ve içme suyu aracılığıyla meydana gelmektedir (Yousef ve ark. 2008, Pan ve ark. 2011).

Arsenik akut toksisitesinin yanında milyarda bir seviyesinde (ppb) uzun süre arseniğe maruz kalma sonucunda potansiyel bir kanserojen gibi davrandığı tespit edilmiştir. Arseniğin kanser oluşumunda rol aldığı, ayrıca yetersiz beslenen toplumlarda kardiyovasküler hastalıklar ve nörotoksik etkilerin gelişme riskinin daha yüksek olmasının arsenik maruziyeti ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bundan dolayı, özellikle gelişmekte olan ülkelerde arseniğin yiyecek, su ve topraktaki düzeyinin izlenmesi çok büyük önem taşımaktadır. Bu küresel sağlık sorunu arsenik kimyasına olan ilgiyi arttırmış, özellikle kanserojen özelliklerinin mekanizmasını açıklığa kavuşturmayı hedefleyen çalışmalar önem kazanmıştır. Kesin mekanizması bilinmemekle birlikte Zamora ve ark. (2014) reaktif oksijen türlerinin arsenik toksisitesinde aracılık ettiğini rapor etmişlerdir.

Ağız yoluyla alındıktan sonra çözünen arsenik bileşikleri sindirim kanalında absorblanır ve kan yoluyla karaciğer, böbrek, dalak, akciğerler ve birçok organa dağılır. Karaciğer, arsenik zehirlenmesinde önemli hedef organdır. Ayala-Fierro ve ark. (1999) sıçan karaciğer hücrelerinin arsenikli bileşiklerle inkübasyonu sonucu laktat dehidrogenaz (LDH) sızıntısının arttığını, bunun sonucunda arseniğin hepatositlerde sitotoksisiteye neden olduğunu bildirmişlerdir.

Arseniğin farklı yükseltgenme basamakları arasındaki dönüşümleri sırasında ROT meydana gelir ve organ zehirlenmelerine sebep olur. Arseniğe bağlı ROT çoğunlukla NADPH oksidaz aracılı metabolik yollarda meydana gelir. Arseniğin sülfhidril gruplarına bağlanma kapasitesine bağlı olarak hücresel glukoz alınımı, yağ asidi oksidasyonu ve glutatyon üretiminde yer alan birçok enzimin aktivitesi inhibe olur (Yousef ve ark. 2008, Pan ve ark. 2011).

Arsenik toksisitesinin gözlenen en erken fiziksel belirtileri melanoz ve hiperkeratoz gibi cilt lezyonlarıdır. Bunlar daha sonra Bowen's hastalığı, bazal hücre ve skuamöz (yassı, pullu) hücreli karsinomalar gibi cilt kanserlerine yol açarlar. Yapılan çalışmalar mideye alınan inorganik arseniğin çeşitli iç organ kanserlerine neden

olduğunu açıklamaktadır. Arsenik Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının (IARC) insan üzerinde kanserojen maddeler listesinde grup 1'de yer almaktadır (Yousef ve ark. 2008).

Monometil arsenöz asit (MMA^{III}) ve dimetil arsenöz asit (DMA^{III}) bütün arsenik metabolitlerinin en toksik olanlarıdır. İnsan arsenik metil transferaz geninin (AS3MT) belli noktalarındaki farklılıklar bireyler arası metilleme kapasitesinde değişikliğe sebep olur. Mevcut veriler insanlardaki üriner arsenik için şu şekilde bir standart profil çizmektedir; %10-30 inorganik, %10-20 $MMA^{(III+V)}$ ve %60-80 $DMA^{(III+V)}$. İnorganik As^{V}'in biyomoleküllerdeki fosfat grubuyla yer değiştirmesi ve arsenolizis mekanizması ile ATP'yi ayırma kapasitesinden akut toksisite gelişmektedir. Arseniğin hem karserojen hem de kemoterapötik ajan olması, eldeki mevcut bilgiler arasında belirgin çelişki oluşturmaktadır. Günümüzde inorganik arsenik akut promiyelositik lösemide (APL) etkin tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (Brima ve ark. 2006).

Mevcut kaynaklarda hem apoptoz ilerletici antitümör etkiler hem de arsenit metabolitlerinin genotoksik etkilerinin ROT ve oksidatif stres yolakları aracılığı ile meydana geldiği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalar MMA^{III} ve DMA^{III}'nın ROT üretimi ile birlikte DNA hasarını da tetiklediğini göstermektedir (Brima ve ark. 2006, Zamora ve ark. 2014).

Yapılan hayvan deneyleri çalışmalarında sıçan, civciv, hamster ve keçilerin günlük beslenmelerinde 25-50 ng/g arseniğe gereksinim duydukları ve bunun arseniğin bir mikrobesin olduğunun kanıtı olduğu açıklanmıştır. Ayrıca arsenik; metiyonini taurin, metil ve poliamin metabolitlerine dönüştürme aşamasında rol almaktadır. Bununla birlikte, çinko metabolizması ve çinko kullanımında da gerekli olduğu rapor edilmektedir (Rodriguez ve ark. 2003).

1.8.1. Biyojenik Arsenik Kaynaklar

Mikroorganizmalar özellikle bazı bakteriler enerjilerini arseniti arsenata oksitleyerek veya arsenatı arsenite hatta arsine (AsH_3) indirgeyerek kazanırlar. Bu nedenle, arsenat redüktaz enzimi bulundururlar.

Bakteriler ve mantarlar arsenatı uçucu metilarsine indirgeyebilirler, deniz algleri arsenatı uçucu olmayan metilli arsenik bileşiklerine dönüştürmektedir. 2010 yılında

Arizona State Üniversitesi'nden Dr. Felise Wolfe Simon ve ekibi California eyaletinde bulunan ve kendine özgü bir ekosisteme sahip olan Mono Gölü'nde biyomoleküler yapısı var olan tüm bakterilerden farklı olan, GFAJ-1 (çok az veya hiç fosfor bulunmayan ortamlarda yaşamını sürdürebildiği bilinen ilk canlı formu) adında yeni bir yaşam türü keşfettiklerini duyurmuşlardır. Mono Gölü denizden üç kat daha fazla tuz oranına sahiptir. Ayrıca, arsenik yoğunluğunun çok fazla olması nedeniyle yaşamı olanaksız kılan bir ekosistem içinde bulunmaktadır. Bu çalışmada, bakterilerin DNA yapılarında fosfat (PO_4^{3-}) yerine arsenat (AsO_4^{3-}) kullandıkları tespit edilmiştir. DNA yapısında arsenik bulunduran ve bu elementin varlığında hayatta kalabilen GAFJ-1'in, aynı zamanda birçok canlının yaşamı için gerekli olan fosfordan bağımsız yaşayabildiği rapor edilmiştir (Wolfe-Simon ve ark. 2011).

1.8.2. Arsenik Kirliliğinin Toksisitesi ve Sağlık Üzerine Etkileri

Arseniğe maruz kalmanın en önemli kaynağı içme sularıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) arseniğin insan sağlığına olan etkilerini, görülme sıklığını, uygun arıtma teknolojilerini, analiz yöntemlerini ve uzun dönemler kullanım sonucu olası kanser risklerini dikkate alarak içme sularındaki izin verilebilir arsenik değerini 10 μg/l olarak belirlemiştir. Bu değerin üzerindeki arsenik derişimlerinin toksik olduğu belirtilmektedir (Mohan ve Pittman 2007). Arsenik zehirlenmesi, ya bir kerede alınan yüksek dozda arsenikten (akut zehirlenme) veya küçük dozlarda ardarda alınmaktan (kronik zehirlenme) kaynaklanır (Hughes 2002, Al Rmallia ve ark. 2005, Brima ve ark. 2006).

Arseniğin zehirlilik derecesi kimyasal formuna bağlı olup "arsin > arsenit As^{3+}> organik As^{3+}> arsenat As^{5+}> organik As^{5+}> arsonyum" sırasına göre değişiklik göstermektedir. Arsenit arsenattan 60 kat, inorganik arsenik ise organik arsenikten 100 kat daha toksiktir (Jain ve Ali 2000, Al Rmallia ve ark. 2005, Brima ve ark. 2006).

Yetişkin bireyler için öldürücü doz 1-4 mg As/kg vücut ağırlığıdır. Arsenit ve arsenatın her ikisi de insan vücudu tarafından güçlü bir şekilde absorbe edilir. Arsenit dokularda birikmeye eğilimlidir. Arsenat ve organik arsenik ise hızlı şekilde böbrekler aracılığıyla atılır. As^{3+} kuvvetli asit gibi davranarak oksijen (O) ve azot (N) ile kompleks oluşturmayı tercih ederken, As^{5+} yumuşak asit gibi davranarak kükürt (S) ile kompleks oluşturmayı tercih etmektedir (Mohan ve Pittman 2007).

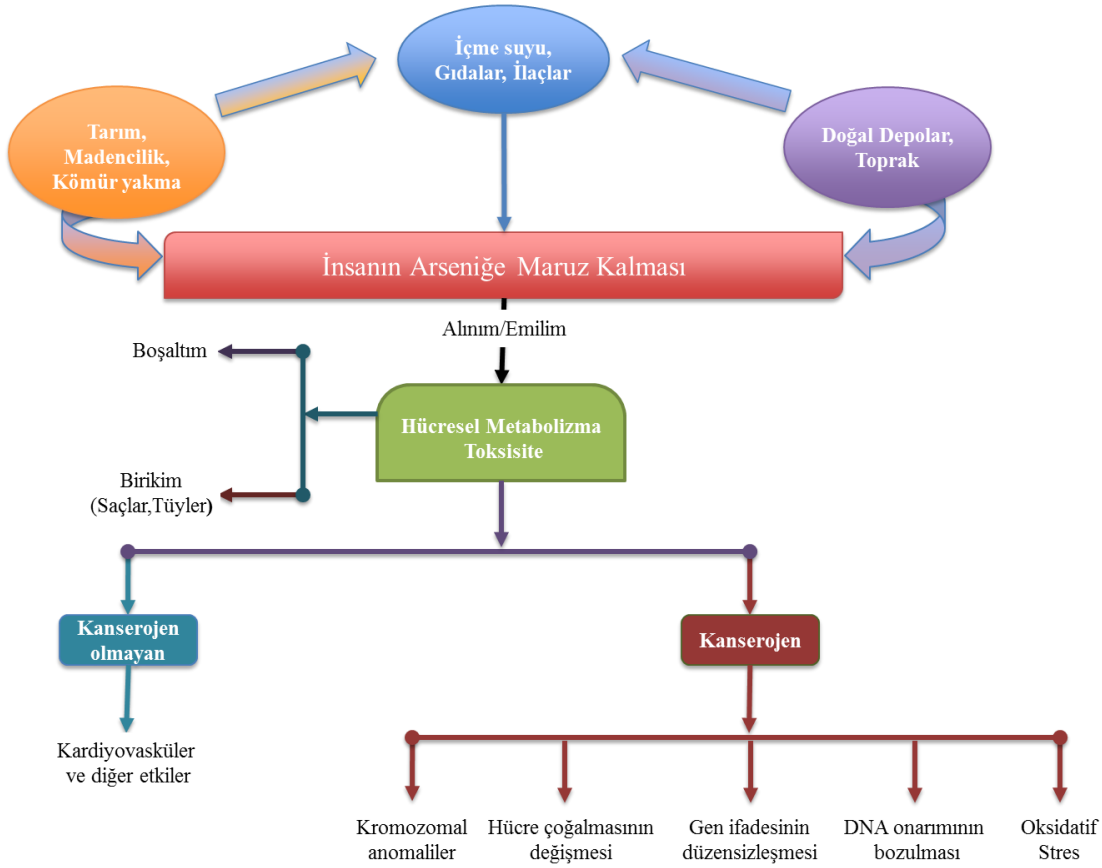
Arsenik renk, tat ve koklama ile belirlenemediğinden, tarihte de ideal bir zehir olarak bilinmektedir. Arseniğin tek seferde 200-300 mg alınımı ölüme sebebiyet verir. Ağızdan alınan akut arsenikle zehirlenmenin başlıca belirtisi mide bulantısı, kusma, ağız ve boğazda yanma ve şiddetli karın ağrısıdır. Bunu takiben, dolaşım bozukluğu ve kalp yetersizliği başlar ve birkaç saat içinde zehirlenme ölümle sonuçlanır (Karakoç 2013).

Kronik arsenik zehirlenmesi ise yavaş yavaş güçten düşme, ishal ya da kabızlık, ciltte tümör gelişimi gösterebilen pullanma ve renk değişikliği, felç ve bilinç bulanıklığıyla ortaya çıkan sinir sistemi bozukluğu, yağ dokusunda bozulma, kansızlık ve tırnaklarda tipik çizgiler belirmesiyle teşhis edilir (Smith ve Smith 2004).

Arsin gazıyla zehirlenmede en belirgin bozukluklar alyuvarların parçalanması ve böbrekte yıkımlarıdır (Al Rmallia ve ark. 2005, Brima ve ark. 2006).

Saç ve tırnak vücudun diğer dokularıyla kıyaslandığında arsenik derişiminin en yüksek olduğu bölgelerdir. Bunun nedeni bu bölgelerin As^{3+} ile kolayca bağlanabilen sülfidril (-SH) grupları içeren keratin bakımından zengin olmasıdır. Düşük doz arseniğe kronik maruziyette sistein içeren proteinlerce zengin olan saç, tırnak ve ciltte arsenik birikir. Tırnaklar günde yaklaşık 0.12 mm uzadığından tek doz arseniğe maruziyetten 100 gün sonra bile tırnakta arsenik bulunabilir (Karakoç 2013).

Arsenik etksini hücrelerin mitokondriyal enzimlerini bozarak da gösterir. As^{3+} bileşiklerinin proteinlerde bulunan sülfidril gruplarına afinitesi yüksek olduğundan mitokondriyal enzim ilgili proteine olan aktivitesini yitirir, As^{5+} ise hücre reaksiyonlarındaki fosfat ile yarışır ve oksidatif fosforilasyonu ayırarak ATP oluşumunu engeller (Roy ve Saha 2002). Şekil 1.8.3'de arseniğin vücuda alınma yollarını alındıktan sonra kansere kadar ilerleyen süreçler özetlenmiştir.



Şekil 1.8.3. İnsanlarda arsenik maruziyetinin kaynakları ve çeşitli arsenik zehirlenmesi biçimleri (Roy ve Saha 2002, Al Rmallia ve ark. 2005, Brima ve ark. 2006)

1.9. Çalışmanın Amaçları, Önemi ve Hedefleri

Amaçlar: Diyarbakır karpuzu (*Citrullus lanatus* cv. "Sürme"), Dicle Nehri kıyısında yetiştirilen karpuz çeşididir (Okumuş ve ark. 2011). Bu çeşidin antioksidan aktivitesi ve organizma üzerine olan etkileri hakkında yapılan literatür araştırmaları sonucu yeterli veri bulunmamaktadır. Bu doktora çalışması kapsamında Diyarbakır karpuzunun *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktiviteleri araştırıldı. Deneysel çalışmalarımızın bir kısmı Dicle Üniversitesi'nde, bir kısmı ise De Montfort Üniversitesi'nde gerçekleştirildi. Seçilen deneysel metotlar zaman ve yer koşullarına bağlı olarak karpuz suyu ve/veya liyofilizata uygulandı.

Amaçlarımızdan birincisi; Diyarbakır karpuzunun *in vitro* antioksidan özelliklerini araştırmaktır. Bunun için; karpuz suyu ve liyofilizatın toplam fenolik ve flavonoid bileşen miktarı ile likopen içeriği tayin edildi. Bundan sonra, karpuz suyu ve liyofilizatın artan miktarlarına bağlı olarak DPPH radikali, ABTS radikali ve hidrojen peroksit söndürme aktiviteleri ile metal şelatlama aktivitesi araştırıldı. Bunlar dışında, karpuz suyunun hidroksil radikalini söndürme aktivitesi ve liyofilizatın indirgeme gücü analizleri yapıldı. Karpuz suyu ve liyofilizatın şeker (fruktoz, glukoz, sukroz) ve bazı vitamin (A, D, E) içerikleri HPLC cihazı ile tespit edildi. Vitamin C içerikleri ise titrimetrik metot ile ölçüldü.

ICP-OES cihazı kullanılarak karpuz suyu ve liyofilizatın bazı element (Ca, Se, Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, Ni, Cd) miktarları belirlendi. Diğer taraftan, ICP-MS cihazı ile de liyofilizatın element (Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Se, Al, As, Pb, Ni, Cd, Cr, Sr, Ba, V, U) analizleri yapıldı.

Liyofilizatın protein içeriği tayin edildi. Daha sonra, proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar üzerine liyofilizatın koruyucu etkileri SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile araştırıldı. Ayrıca plazmid DNA'yı, hidrojen peroksidin UV ile etkileşmesi sonucu oluşan hidroksil radikalinin meydana getirdiği hasara karşı koruyucu etkisi agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

Bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında ikinci ve üçüncü amaçlarımız ise; Diyarbakır karpuzunun bazı kanser hücre hatlarına etkisi ve canlı organizma üzerine sitotoksik etkisini *in vitro* araştırmaktır. Bunun için; liyofilizatın MCF-7 (meme), HepG2 (karaciğer) ve BeWo (koryokarsinom) kanser hücre hatları üzerinde %

inhibisyon etkisi ve liyofilizat uygulanan bu hücrelerin % canlılık oranları MTT deneyi yapılarak araştırıldı. Liyofilizatın *V. fisheri* bakterisi üzerinde sitotoksisitesi ise mikrotoks temel test yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Dördüncü ve son amacımız ise; As (III) ile *in vivo* doku hasarı oluşturulmuş sıçanlarda karpuz suyu ve liyofilizatının etkilerini incelemektir. Bunun için, 14 gün ve 28 gün arsenik verilen sıçanların serumlarında kan şekeri, trigliserid, kolesterol ve karaciğer enzim testlerinden aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), albumin ile total bilirubin düzeyleri belirlendi. Arsenik uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda protein miktarı, protein karbonil miktarı ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Son olarak da karaciğer dokusunda endojen antioksidan enzimlerden olan katalazın aktivitesi ölçüldü.

Önemi ve Sonuçlar: Reaktif oksijen türleri normal fizyolojik olaylar sırasında oluşabilir ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatıp, lipid peroksitlerin birikmesine öncülük edebilirler. Ancak, ROT antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılırlar. ROT oluşumu ve antioksidan sistem tarafından etkisizleştirilmesi arasında bir denge vardır. Patolojik durumlarda bu denge bozulup, ROT oluşumu oksidatif strese neden olmaktadır. ROT ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik hücresel membranlar veya hücre içi moleküllerde oksidatif modifikasyonlara yol açar. Antioksidanlar organizmayı serbest radikallerden ve ROT etkilerinden korur ve birçok kronik hastalığı geciktirir. Bu özelliklerinden dolayı antioksidan bileşiklere olan ilgi artmış, son yıllarda özellikle bitki kaynaklı antioksidanlar araştırma konusu olmuştur. Bundan dolayı, bu çalışmada öncelikle Diyarbakır karpuzunun serbest radikalleri söndürme etkileri ve antioksidan aktiviteleri araştırıldı.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde; Diyarbakır karpuzu ve liyofilizatının toplam fenolik ve flavonoid bileşen miktarı ile likopen içeriğinin kaynak araştırması sonucu ulaşılan çalışmalarda rapor edilen diğer karpuz çeşitlerinin verilerine göre yüksek olduğu tespit edildi. Likopen serbest radikal söndürücü olarak güçlü bir antioksidan ve karotenoidler arasında en etkili singlet oksijen süpürücüdür. Ayrıca, fazla sebze ve meyve tüketiminin sağlık açısından yarar sağladığı, bunun da doğal gıdalarda bulunan karotenoid, flavonoid, fenolik bileşikler ve vitaminler gibi antioksidan

bileşenlerden kaynakladığı rapor edilmektedir. Bununla birlikte, yukarıda sıraladığımız bütün antioksidan parametrelerde karpuz suyu ve liyofilizatın iyi etki gösterdiği tespit edildi. Liyofilizatın proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ve hidrojen peroksidin UV ile etkileşmesi sonucu oluşan hidroksil radikalinin oluşturduğu plazmid DNA hasarı üzerine yüksek koruyucu etkileri ölçüldü. Bunlara ilaveten, 24 saatlik uygulama sonunda liyofilizatın MCF-7, HepG2 ve BeWo kanser hücre hatlarının canlılığı üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edildi. Ayrıca, belli konsantrasyonlardaki liyofilizatın 5 dakika ve 15 dakika sonra *V. fisheri* bakterisine sitotoksik etkisi olmadığı belirlendi.

Diyarbakır karpuzunun insan vücudundaki elektrolit dengeleri ile hücresel aktivite ve metabolizma gibi ana fizyolojik süreçler için gerekli olan Na, K, Ca ve Mg elementleri açısından zengin olduğu tespit edildi. Bunlara ilaveten hem metabolik ajan ve enzim katalizörü olan hem de biyolojik yapıların esansiyel bileşenlerini oluşturan Fe, Mn, Zn, Co, Cu ve Se tayin edildi. Ayrıca Al, As, Pb, Cr, Cd, Ni, Sr, Ba, V, U ağır metallerinin oranının oldukça düşük olduğu tespit edildi.

Arsenik yerkabuğunun her tarafında bulunan en yaygın eser elementlerdendir. Doğal mineral olarak ve 200'den fazla mineral türünün yapısında bulunur, buralardan yeraltı sularına salınır. Dünya genelinde pek çok ülkede arsenik konsantrasyonu toksik düzeyde olan yeraltı suları içme suyu olarak kullanılmaktadır. Yeraltı sularında arsenik problemi olan başlıca ülkeler Arjantin, Bangladeş, Şili, Çin, Macaristan, Hindistan, Meksika, Tayvan, Vietnam, Romanya ve ABD'nin özellikle güneybatı eyaletleridir. Türkiye'de son yıllarda özellikle batı bölgelerinde içme sularında arsenik için belirlenen maksimum sınır olan 10 µg/l'den daha yüksek miktarda arsenik içeren içme suyu kaynakları tespit edilmiştir. Bunun sonucunda Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı **"**İnsani gelişme raporu 2006 kıtlığın eşiğinde: göç, yoksulluk ve küresel su krizi" adlı raporunda Türkiye'yi arsenik kirlenmesi olasılığı bulunan ülkeler arasında göstermiştir.

Bangladeş gibi üçüncü dünya ülkeleri ve ülkemizde gerek şehirlerde ve gerekse kırsal kesimde yaşayan halk arasında kil ve toprak yeme alışkanlığı önemli oranda dikkat çekicidir. Killer mineral karışımlarıdır. Kil ve toprak yeme alışkanlığı diğer adıyla jeofajia; besleyici değeri olmayan bir maddenin ya da bir gıdanın düzenli ve aşırı miktarda yenmesi ile tanımlanan bir davranış bozukluğudur. Çocukluk yaş grubunda ve

hamile kadınlarda daha fazla olmak üzere, tüm toplumlarda kil ve toprak yeme alışkanlığı görülebilir. Bu alışkanlık, modern toplumlarda rastlanmamakla birlikte, geleneksel topluluklar arasında ve ekonomik gelişmişlik düzeyi düşük olan ülkelerde yaygındır. Bazı hamile kadınların, demir eksikliğini giderdiğine inanarak kil yediği ve bu durumun da düşüklere ve sakat doğumlara yol açabileceği bildirilmektedir. Ortaya çıkabilecek diğer sağlık sorunlarının başında kurşun ve arsenik gibi ağır metal zehirlenmeleri gelmektedir. Besin değeri olmayan gıdaların yenilmesi gerçek besinlerin yerini alıp beslenme eksikliğine sebep olabilmektedir.

Arsenik zehirlenmesi oksidatif stresle ilişkilidir. Arsenik insan vücudunda redoks döngüsü ve metabolik aktivasyon sürecinde ROT üretimine neden olur. Arsenik verilen sıçanlarda 28 gün sonunda karpuz suyu ve liyofilizatın kontrol grubuna göre yükselmiş alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz ve bilirubin seviyesini düşürdüğü, azalan albumin seviyesini ise yükselttiği tespit edildi. Bunlara ilaveten, karaciğer dokusunda oluşan protein karbonil ve malondialdehid seviyesini önemli oranda düşürdüğü belirlendi.

Hedefler: Günümüzde, birçok bilimsel araştırma güvenli ve etkili antioksidan bileşiklerin keşfi üzerine yoğunlaşmıştır. Karpuz mevsimlik bir meyvedir ve bütün bir yıl boyunca bulunmamaktadır. Karpuzun bileşenlerinin çıkarılabilmesi ve bütün bir yıl boyunca ulaşılabilir hale getirilmesi yüksek besin değeri açısından önemlidir.

Bu doktora tez çalışmasının ana hedefi; Dicle nehri kıyısında yetişen Diyarbakır karpuzunun *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktivelerini araştırmak, elde edilen veriler ışığında daha kapsamlı, bilim ve sanayi odaklı proje veya projelerin gerçekleştirilmesine zemin hazırlamaktır. Bundan dolayı, yapılan deneysel çalışma yelpazesi geniş tutulmuştur. Diğer hedefimiz ise, yok olmaya yüz tutmuş Diyarbakır karpuzunu gündeme taşımaktır.

Bu tez çalışmasının hikayesi; Eylül 2009'da Dicle Üniversitesi'nde gerçekleşen İkinci Uluslararası Biyofizik ve Biyoteknoloji Kongresi'ne katılan Dr. Parvez I. Haris'in Diyarbakır karpuzunun sağlık özerine etkilerini araştırması sonucu literatür bilgisine ulaşamaması ve bu anlamda ortak bir proje yürütmek üzere Dicle Üniversitesi'nde doğal ürünlerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili çalışma yapan bilim insanı arayışına girmesiyle başlamıştır. İki üniversitenin konu ile ilgili araştırma

laboratuvarlarının teknik alt yapısına göre proje şekillenmiştir. Bu proje sonuçlarının aşağıdaki gelişmelere katkı sağlaması hedeflenmektedir:

Dünya çapında karpuzla ilgili yüzlerce bilimsel çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. Buna rağmen, yerel bir çeşit olan Diyarbakır karpuzunun sağlık üzerine etkisiyle ilgili bilimsel çalışma bulunmamaktaydı. Bu projeye başladıktan sonra, 2011'de araştırma grubumuzun yaptığı "Protective effect of Diyarbakır watermelon juice on carbon tetrachloride-induced toxicity in rats" isimli çalışma "Food and Chemical Toxicology" dergisinde yayınlanarak bu alandaki ilk bilimsel çalışma olmuştur. Karpuz ile ilgili yapılan birçok bilimsel çalışmaya referans olunup, literatüre katkı sağlanmıştır. Ayrıca bu tez çalışmamızın kapsamı ile de bu katkının artacağı düşünülmektedir.

Günümüzde Diyarbakır karpuz yetiştiriciliği yok olmaya yüz tutmuştur. Sadece Sürme çeşidi karpuz festivali için yetiştirilmektedir. Melez karpuzların hem tadı daha güzel hem de yetiştirme koşulları daha uygun olduğu için ekonomik anlamda tercih edilmektedirler. Ulaştığımız bilimsel veriler ışığında, dikkati karpuzun sağlık üzerine olumlu etkilerine çekip, yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan Diyarbakır karpuzunun bölge dışında da kolay ulaşılabilir doğal ürün olduğunun gündeme getirilerek bölge tarım ve sanayisine katkı sağlanacağı öngörülmektedir.

Gıda üretiminde ve piyasadaki bazı ürünlerde peroksidasyon sürecini geciktirmek veya önlemek (gıdaların raf ömrünün uzatılması) amacı ile bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer-bütilhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak, sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmaların yapılması ile bazı ülkelerde sentetik antioksidan kullanımına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir. Bu tezin çıktılarından bir tanesi de Diyarbakır karpuzunun ilaç ve gıda katkı endüstrisi için doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği projelere öncülük etmesi olduğunu düşünmekteyiz.

Çeşitli markalar karpuz aromalı kozmetik ürünleri, oda spreyleri ve temizlik malzemesi ile sakız üretmektedir. Diyarbakır karpuzunun içerdiği aromatik uçucu bileşenleri ile ilgili KOSGEB projeleri gibi sanayi odaklı projelere öncülük ve danışmanlık edilebilecektir.

Diyarbakır karpuzu besin değeri yüksek, doğal bir üründür. İnsan vücudu için esansiyel olan elementler karpuzda bulunmaktadır. Ayrıca, bol yetiştirilen ucuz bir meyvedir. İnsanların dikkatlerini bu yöne çekip, özellikle kırsal kesimde kil ve toprak yeme alışkanlığının olduğu yerlerde karpuz tüketiminin arttırılmasına yönelik çalışmalara danışmanlık hizmeti sunmak hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Epidemiyolojik çalışmalar sonucu sebze ve meyve bakımından zengin diyetlerin insanlardaki kalp hastalıkları ve belirli kanser türlerinin insidansını azalttığı tespit edilmiştir (Hasler 1998). Beslenme rejiminin β-karoten ve likopen gibi karotenoidlerce zengin tutulması ile azalmış kanser görülme sıklığı arasında ilişki vardır. Likopen kırmızı bir pigmenttir ve doğal olarak bitki ve alg dokularında bulunmaktadır. Serbest radikal tutucu özelliğinden dolayı oldukça etkili bir antioksidandır. Perkins-Veazie ve ark. (2001) aynı bölgede yetiştirilen çekirdekli ve çekirdeksiz 11 karpuz çeşidinin ortalama likopen içeriğini 48.7 µg/g taze ağırlık belirlemişler ve bu değerin karpuzun üretim sezonuna bağlı olarak değiştiğini rapor etmektedirler.

Domates ve domates ürünlerinin tüketiminin artmasına bağlı olarak kanser oluşma riskinin azalması domatesin yağda çözünen bileşeni likopenle ilişkilendirilmektedir. Djuric ve Powell (2001) yaptıkları çalışmada likopen içeren yiyeceklerin (ketçap, taze domates, domates salçası, domates püresi, domates çorbası, domates suyu, sebze suyu, domates konservesi ve karpuz) sulu ve organik fraksiyonlarının troloks-ekivalent antioksidan kapasitesini incelemişler. Karpuz ve domates salçasının antioksidan aktivitesi benzer, test edilen diğer yiyeceklerin sulu fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi ise bunlardan yüksek rapor edilmiştir. Likopen içeriği ise domates suyu ve sebze suyunun iki fraksiyonunda benzer, ketçap ve domates püresinin sulu fraksiyonlarında ve diğer yiyeceklerin organik fraksiyonlarında daha fazla rapor edilmektedir.

Leong ve Shui (2002) Singapore'daki marketlerden temin edilen ve yaygın olarak tüketilen 27 çeşit meyvenin antioksidan kapasitesini ABTS serbest radikal renksizleştirme testi ile DPPH serbest radikal söndürme testlerini kullanarak incelemişler. Aynı çalışmada, C vitamini içeriği RF-HPLC ile tayin edilip bunun toplam antioksidan kapasiteye olan etkisi ölçülmüştür. Karpuzun askorbik asit içeriği 3.7 ± 0.2 (mg/100 g) ve L-askorbik aside ekivalent antioksidan kapasitesi 11.9 ± 0.1 (mg/100 g) olarak tespit edilip bunun toplam antioksidan kapasiteye oranı %31.0 olarak rapor edilmektedir.

Pino ve ark. (2003) karpuz meyvesinin uçucu bileşenlerini çözücü ekstraksiyonu ile izole etmişler. Bu meyvede toplam uçucu bileşenler 7.6 mg/kg olarak bulunmuştur. Başlıca bileşenler; etil asetat, asetaldehit, tetradekanoik asit ve metil asetat olarak bulunmuştur.

Karpuz, sıcak yaz mevsimi boyunca susuzluğu dindirdiği bilinen önemli bir meyvedir. Karpuz suyu likopence zengin bir kaynaktır (Perkins-Veazie ve Collins 2004). Geleneksel olarak, domatesin likopen açısından en zengin kaynak olduğu bilinmektedir. Oysa, Edwards ve ark. (2003)' nın yaptığı bir çalışmada taze karpuzun likopen içeriği 4868 µg/100 g olarak bulunmuştur, bu da çiğ domatesin likopen içeriğinden %40 daha fazladır (3025 µg/100 g domates).

Karpuz, kuraklığa dayanmada önemli bir role sahip olan sitrulin amino asidi bakımından zengin doğal bir kaynaktır (Kawasaki ve ark. 2000). Sitrulin ilk olarak karpuz suyundan tanımlanmıştır. Rimando ve Perkins-Vezaie (2005), GC-MS ile farklı türlerdeki taze karpuzların sitrulin miktarının 0.7-3.6 mg/g arasında değiştiğini rapor etmektedirler.

Karpuz, aynı zamanda mükemmel C vitamini kaynağıdır ve özellikle β-karoten içeriğinden dolayı A vitamini açısından zengindir. Bu vitaminler de vücudun serbest radikalleri etkisizleştirmek için ihtiyaç duyduğu önemli antioksidanlardır. 100 g karpuzda 8.1 mg C vitamini ve 569 IU A vitamini bulunduğu rapor edilmektedir. Bu miktarlar da günlük C vitamini ihtiyacının %13.5 ve günlük A vitamini ihtiyacının %11.38'dir. Karpuz aynı zamanda, iyi bir B vitamini (B_1 ve B_6) ve potasyum ile magnezyum kaynağıdır (Quek ve ark. 2007).

Sitrulin insanlar için esansiyel bir amino asit olan arginine metabolize olur. Arginin nitrik oksit (NO) sentezinde kullanılan azotlu bir substrat olup, kardiyovasküler ve immün fonksiyonlarda rol almaktadır. Collins ve ark. (2007), karpuz suyu tüketiminin sağlıklı yetişkin aç bireylerde plazma arginin, ornitin ve sitrulin konsantrasyonunu yükseltip yükseltmediğine bakmışlar. Üç hafta düşük doz karpuz suyu uygulamasından sonra açlık plazma arginin konsantrasyonunun %12 arttığı; 3 haftalık yüksek doz karpuz suyu uygulamasından sonra plazma arginin ve ornitin konsantrasyonunun sırasıyla %22 ve %18 arttığını gözlemişler. Açlık sitrulin konsantrasyonları kontrole göre artmamıştır fakat çalışma boyunca sabit kalmıştır.

Arginin ve ornitinin yükselmiş açlık plazma konsantrasyonuna karşılık sitrulin konsantrasyonunun sabit kalması karpuz suyu tüketiminden kaynaklanan plazma sitrulininin etkili bir şekilde arginine dönüştüğünü göstermektedir. Bu sonuçlar plazma arginin konsantrasyonunun karpuz tüketimi ile alınan sitrulin ile arttırılabildiğini göstermiştir.

Taze gıda, görünümünün iyi olması ve sağlıklı olmasından dolayı tüketicinin ilgisini çekmektedir. Az işlem görmüş ürünler perakende piyasasında da önemli bir yer kaplamaktadır. Karpuz antioksidan kapasiteye sahiptir, C vitamini, likopen ve toplam fenolik bileşik miktarı açısından zengin bir meyvedir. Hasat edildikten kısa bir süre sonra kesilen taze karpuzun bu parametrelerinde zaman ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik meydana gelmektedir. Kısa süre ve düşük sıcaklıkta ($\geq$5 ^{o}C) saklama koşullarında karpuzun antioksidan kapasitesinde önemli bir değişiklik gözlenmemektedir. Oms-Oliu[a] ve ark. (2009)'nın yaptığı bir çalışmada, taze kesilmiş karpuzun ilk antioksidan potansiyelinin 14 günde en iyi saklama sıcaklığı 5 ^{o}C olarak tespit edilmiştir. Likopen, C vitamin, antioksidan kapasite ve toplam fenolik bileşikler için aktivasyon enerjileri ise sırasıyla; 56.5 kJ/mol, 55.9 kJ/mol, 34.5 kJ/mol ve 26.9 kJ/mol olarak tespit edilmiştir. Bunun sonucu olarak; likopen, C vitamini ve antioksidan kapasite ile ilgili tepkimelerin sıcaklığa duyarlılığının toplam fenolik bileşiklerle benzer olduğu gözlenmiştir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda dünyanın çeşitli bölgelerinde kronik dejeneratif hastalıkların daha düşük görülme riski sebze ve meyve tüketimindeki artışla ilişkilendirilmektedir. Sebze ve meyvelerin fenolik bileşikler ve antioksidan aktivite açısından zengin oldukları rapor edilmektedir. Vijaya Kumar Reddy ve ark. (2010) Hindistan'da yaygın olarak tüketilen 14 meyve çeşidinin antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik bileşen miktarını incelemişler. Karpuzun toplam fenolik içeriği 26 ± 2.5 mg/100 g, ABTS radikalini söndürme etkisi (troloks ekivalenti) 23 ± 3.8 mg/100 g ve DPPH radikalini söndürme aktivitesini (troloks ekivalenti) 32 ± 4.6 mg/100 g olarak rapor etmişlerdir.

Altaş ve ark. (2011)'nın yaptığı çalışmada Diyarbakır karpuzu suyunun sıçan karaciğer, böbrek ve beyin dokularında meydana gelen lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. 28 gün boyunca haftada bir defa karbon tetraklorür (CCl_4)

uygulanması sonuncu karaciğer hasarı oluşturulmuş, kontrol grubu ile karşılaştırılınca hasarlı karaciğer serum markır (aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT)) düzeylerinin ve toplam bilirubinin (TB) önemli oranda yükseldiği, albumin değerinin ise düştüğü gözlenmiştir. CCl_4'ün karpuz suyu ve ursodeoksikolik asit (UDCA) ile verilmesi ise bu değişiklikleri anlamlı oranda önlemiştir. Sıçanlara CCl_4 uygulaması sonucu karaciğer, böbrek ve beyin dokularında lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesi artmış, karpuz suyu ve UDCA uygulanan gruplarda LPO'nun önlendiği gözlenmiştir. Elde edilen bu verilerden, deneysel CCl_4 ile sıçanlarda oluşturulan toksisitede karpuz suyunun karaciğer, böbrek ve beyin dokularını koruduğu ve lipid peroksidasyonu oluşumunu önlediğini; bu koruyucu etkisinin de antioksidan aktivitesine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Choo ve Sin (2012) yaptıkları çalışmada, çekirdekli karpuzun iki çeşidi olan kırmızı ve sarı etli karpuzların bütün karpuz ve etli kısımlarının askorbik asit, likopen ve antioksidan aktiviteleri (DPPH, metal şelatlama) analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak L-askorbik asit kullanılmıştır. Kırmızı etli karpuzun etli kısmının askorbik asit (86.32 mg/kg) ve likopen (9.50 mg/kg) içeriği pozitif kontrol ve sarı etli karpuzdan daha yüksek bulunmuştur. Kırmızı etli karpuzun bütün meyvesinin de likopen içeriği daha yüksek çıkmıştır ancak, askorbik asit içeriği benzer çıkmıştır. Kırmızı etli karpuzun DPPH radikalini söndürme aktivitesi likopen içeriği gibi daha yüksek bulunmuştur. Bunun tersine, sarı etli karpuzun metal şelatlama aktivitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

C. lanatus kültür bitkisi 'sentinel' ekstraktının kanda yüksek kolesterol seviyesine bağlı olarak gelişen ateroskleroz üzerine etkileri farelerde incelenmiştir. Sentinel ile beslenen farelerin plazma sitrulin konsantrasyonlarında önemli oranda artış tespit edilmiştir. Bu grupta kilo artışı ve vücut yağ oranının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, plazma kolesterol düzeyinde düşme ve azalan ateroskleroz rapor edilmiştir (Poduri ve ark. 2013).

Meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve normal meme epitelyal hücre hattı MCF-10'nun hücre proliferasyonu sırasında likopen tarafından modüle edilen proteinlerin etki mekanizmasını belirlemek amacıyla, Uppala ve ark. (2013) *in vitro* proteomik bir çalışma yapmışlar. Bu çalışmada, MCF-7 ve MCF-10 likopenin farklı konsantrasyonları

(0, 2, 4, 6, 8 ve 10 μM) ile 72 saat muamele edilmiştir. Bu işlemden sonra, hücre çoğalmasını ölçmek için MTT tetrazolyum indirgeme deneyi ve protein ifadesindeki değişiklikleri değerlendirmek için iki boyutlu floresans diferansiyel jel elektroforezi yapılarak MALDİ TOF/TOF ve Mascot veritabanı kullanılmıştır. MTT ve hücre proliferasyon deneyleri likopenin seçici olarak MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği fakat, MCF-10 hücrelerini etkilemediği rapor edilmiştir. Diferensiyel jel elektroforez çalışmaları MCF-7 hücrelerinde bulunan proteinlerin likopene farklı yanıt verdiğini ifade etmiştir. Likopenin sitokeratin 8/18 (CK8/18), CK19 ve bunların post-tranlasyonel durumunda proteinlerin ifade seviyelerini değiştirdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, likopenin hücre döngü proteinleri beta tubulin, CK8/18, CK19 ve ısı şok proteinlerini modüle ettiği rapor edilmiştir.

Karpuz kabukları sulu ekstresinin analjezik etkinliği Eddy sıcak plaka yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Bu çalışma için, Swiss albino fare kullanılmıştır. Karpuz kabukları ekstresi kullanılan bütün dozlarda (250, 500 ve 1000 mg/kg) etki göstermekle birlikte doza bağlı olarak artan analjezik etki tespit edilmiştir. Diklofenak sodyum (5 mg/kg) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol ve numune uygulamasından 90 dakika sonra elde edilen etki süresi sırasıyla 12.36 dk, 5.15 dk, 8.92 dk ve 10.82 dk olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada, karpuz kabuğu sulu ekstresinin iyi analjezik etki gösterdiğini ve geleneksel NSAID'lere alternatif olabileceği rapor edilmiştir (Kumari ve ark. 2013).

Kim, Park ve ark. (2014) karpuz suyunun ve karpuzun kırmızı kısmından ekstraksiyon metoduyla elde ettikleri likopen ekstraktının toplam fenolik, flavonoid ve likopen içeriğini tayin edip, likopen ekstraktının antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, domatesten ekstrakte edilen likopen (ticari olarak), askorbik asit ve troloks kontrol numunesi olarak kullanılmıştır. Karpuz suyunun 100 gramında tayin edilen toplam fenolik (110.0 ± 1.9 mg GAE) ve flavonoid (14.1 ± 0.2 mg QUE) miktarı likopen ekstraktının toplam fenolik (12.3 ± 0.5 mg GAE) ve flavonoid (5.4 ± 0.3 mg QUE) içeriğinden yüksek iken, likopen içeriği (11.3 ± 0.1 mg) ise likopen ekstraktının içeriğinden (352.4 ± 7.6 mg) oldukça düşük çıkmıştır. Karpuz likopen ekstraktı domates likopen ekstraktından daha yüksek trolokstan ise daha düşük DPPH radikalini söndürme ve FRAP aktivitesi göstermiştir. Bunlara ilaveten, süperoksit radikalini söndürme aktivitesi deneyinde karpuz likopen ekstraktı ve troloks benzer etki

gösterirken domates ekstraktının oldukça düşük etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, karpuz likopen özütü askorbik asitten daha yüksek anti-inflamatuvar etki göstermiştir.

Karpuz, yüksek oranda antioksidan içeren doğal bir ürün olup iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra dokularda serbest radikal üretimi nedeniyle meydana gelen oksidatif hasarı engelleyebilmektedir. Mohammad ve ark. (2014)'nın yaptığı çalışmada, farelerde düşük doz X-ışını maruziyeti sonucu meydana gelen oksidatif hasara karşı karpuz suyunun radyasyondan koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Dört haftalık fareler iki gruba ayrılmıştır, bir grup 28 gün boyunca filtre edilmiş su ve normal yem ile beslenirken diğer grup %50 karpuz suyu ile çeşme suyu karışımı ve normal yem ile beslenmiştir. Her iki gruba da 29. gün düşük doz x-ışını uygulanmıştır. Beyin, akciğer ve karaciğer dokularında meydana gelen malondialdehit (MDA) seviyesi ile glutatyon (GSH) seviyesi ve süperoksit dismutaz (SOD) inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Karpuz suyu ile beslenen grupta oluşan MDA seviyesi daha düşük ölçülmüştür. Ayrıca, karpuz suyu ile beslenen grupta GSH seviyesi ile SOD aktivitesi de daha yüksek çıkmıştır.

Ekstraksiyon prosedürü boyunca yüksek sıcaklık ve basınç altında süper kritik koşullarda su kullanılması yöntemine hidrotermal ekstraksiyon denilmektedir. Hidrotermal ekstraksiyon tekniklerinde 100 ^{o}C ve 374 ^{o}C sıcaklıklarda ve yüksek basınç altında özütleyici (ekstraktant) olarak su kullanılmaktadır. Bu durumda, ekstraksiyon işlemi esnasında su sıvı halde muhafaza edilir ancak, suyun hidrojen bağları zayıflar ve kırılır. Bu nedenle, hidrotermal halde su daha az polar hale gelir, çeşitli organik bileşiklerin sudaki çözünürlüğü artar, ester ve eter bağlarını hidrolizleyebilir. Hidrotermal ekstraksiyon metodu doğal matrislerden çeşitli antioksidan ve fonksiyonel bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır (Dharmaraj ve Malleshi 2011). Kim, Matsushita ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, karpuzun farklı kısımlarından (etli kısmı, beyaz kabuk ve yeşil kabuk) hidrotermal ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların DPPH ve ABTS radikalini söndürme aktivitesi, indirgeme gücü, likopen, *β*-karoten ve toplam fenolik bileşen miktar tayini ve GC/MS ile bazı biyoaktif molekül içerikleri incelenmiştir. Bu işlem sırasında, 100 ^{o}C-300 ^{o}C farklı sıcaklıklarda ve farklı zamanlarda (10, 30, 60 dakika) ekstraktlar elde edilmiştir. Yeşil kabuktan 300 ^{o}C'de 30 dakikada elde edilen ekstraktın toplam fenolik bileşen miktarı en yüksek (7626.52 ± 39.91 µg GAE/g) bulunmuştur. Diğer taraftan, sıcaklık ve zaman arttıkça bütün

ekstrakların likopen ve *β*-karoten içerikleri azalmıştır. Bunların aksine, sıcaklık ve zaman arttıkça bütün ekstrakların antioksidan aktiviteleri de artmıştır. Ayrıca, katekol gibi bazı yeni fenolik bileşikler ve bunların türevleri hidrotermal ekstraktlarda tayin edilmiştir.

Dünya çapında milyonlarca insan içme suyu vasıtasıyla kronik olarak inorganik arseniğe maruz kalmaktadır. Bangladeş ve Hindistan'da sadece 100 milyon insan arsenikten etkilenmektedir. İnorganik arseniğe maruz kalma cilt, akciğer, karaciğer ve mesane kanserleri ile melanoz ve keratoz gibi cilt hastalıklarıyla ilişkilendirilmektedir (Brima ve ark. 2006). Bangladeş ve Hindistan'da arsenikle kirlenmiş yeraltı suyu tarımsal sulama ve hayvan tüketimi için kullanılan bitkilerin sulamasında sık sık kullanılmaktadır. Arsenik buradan insan gıda zincirine katılmaktadır. Brima ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada, Bangladeş'ten Birleşik Krallık'a ithal edilen sebze, pirinç ve balık gibi gıda maddelerinin arsenik konsantrasyonlarını tespit etmek amacıyla grafit fırınlı atomik absorpsiyon cihazı kullanılmıştır. Bangladeş'ten ithal edilen sebzelerin ortalama arsenik konsantrasyonu 54.4 µg/kg, toplam arsenik konsantrasyon aralığı ise 5-540 µg/kg olarak ölçülmüştür. Tatlısu balıklarının toplam arsenik içerikleri 97-1318 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, İngiltere'de yetiştirilen sebzelerin arsenik içeriğinin Bangladeş'ten ithal edilenlere göre 2-3 kat daha düşük olduğu rapor edilmektedir (Al Rmallia ve ark. 2005).

Hindistan ve Bangladeş'de içme sularından kaynaklanan arseniğin nüfusun çok önemli bir kısmını etkilediği bilinen örneklerdendir. Son yıllarda Türkiye'de özellikle batı bölgelerde içme sularında arsenik için belirlenen maksimum kirletici seviyesi olan 10 µg/l'den daha yüksek miktarda arsenik içeren içme suyu kaynakları tespit edilmiştir. Bunun sonucu olarak, Türkiye arsenik kirlenmesi olasılığı bulunan ülkeler arasında gösterilmeye başlanmıştır (Başkan ve Pala 2009, Atabey 2011).

Yapılan bazı çalışmalarda, Türkiye'de mevzuat limiti üst seviyesinden daha yüksek konsantrasyonda arsenik içeren bazı su kaynakları ve buralarda ölçülen arsenik konsantrasyonları şöyledir; Emet-Kütahya 448 µg/l (içme suyu) (Oruç 2004), Hisarcık-Kütahya 380 µg/l (çeşme suyu), 50 µg/l (kuyu suyu), 510 µg/l (yüzeysel su) (Çöl ve Çöl 2004), İğdeköy-Emet-Kütahya 10-20 µg/l (yüzeysel su), 10-7754 µg/l (yeraltı suyu) (Çolak ve ark. 2003), Bursa 0.051-21.423 µg/l (içme suyu kaynağı) (Erdol ve Ceylan

1997), Bigadiç-Balıkesir 30-900 µg/l (yeraltı suyu) (Gemici ve ark. 2008), Eşme-Uşak 50 µg/l (yeraltı suyu) (Çamtepe 2006).

İzmir Kanalizasyon İdaresi Genel Müdürlüğü (İZSU) tarafından yapılan ve birçok basın organında açıklanan sonuçlara göre 2008 yılında İzmir'e bağlı bazı ilçelerden Göksu'da 59 µg/l, Sarıkız'da 32 µg/l, Menemen'de 10 µg/l ve Halkapınar'da ise 13 µg/l arsenik konsantrasyonu ölçülmüştür.

Kuyu sularında doğal olarak oluşan arsenik kirliliğinin suyun bulunduğu derinlikteki kaya türü, mineral ve cevher yapıdan kaynaklandığı bildirilmektedir (Başkan ve Pala 2009).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

Dicle Nehri kıyısında bulunan Diyarbakır Merkeze bağlı Erimli Köyü'nde Karpuz Festivali için karpuz yetiştiren çiftçilerden 2010-2014 yıllarında hasat döneminde temin edilen Diyarbakır karpuzunun Sürme çeşidi materyal olarak kullanıldı. Her dönem hazırlanan karpuz suyu ve liyofilizatın pH, toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid bileşen miktarı tayini ile DPPH radikalini söndürme aktivitesi testleri çalışılıp önceki dönemde deneylerde kullanılan numunelerle benzer sonuç elde edilen karpuz suyu ve liyofilizat ile yeni analizler yapıldı.

3.1.1. Diyarbakır Karpuzu

Diyarbakır, karpuzla özdeşleşmiş bir ilimizdir. Diyarbakır ilinin toplam sebze bahçeleri alanı 808 488 hektardır. Bu alanda üretilen toplam sebze miktarı 28 448 218 tondur. Bu ilimizde 6 624 hektar alanda 196 190 ton karpuz üretilmektedir. Bunun büyük bir çoğunluğunu da Diyarbakır karpuzu oluşturmaktadır (TUİK 2013).

Diyarbakır karpuzu (*C. lanatus* cv. "Sürme") (Pirinç ve ark. 2003) olarak ünlenen yöre karpuzu için Türk Patent Enstitüsü tarafından "Coğrafi İşaret Tescil Belgesi" alınarak Diyarbakır Karpuzu tescilli bir marka olmuştur (TPE 2008) (Ek 6).

Dicle nehri kenarında çakıllı, kumlu arazilerde yöreye özgü yöntemlerle yetiştirilen Diyarbakır karpuzunun göze çarpan özelliği iriliği ve lezzetli oluşudur. Ancak, günümüzde bu lezzetini yitirmiştir. Diyarbakır karpuzunun önceden var olan bu lezzetini yörede halen söylenmekte olan şu maniden de anlamak mümkündür.

Teptim tekerlendi
Kestim şekerlendi
Bal gibi tatlı içi
Ne güzeldir yenişi
Hem erkektir hem dişi (Beysanoğlu 1977)

Diyarbakır karpuzunun kendine has yetiştirme tarzı kuyu karpuzculuğudur ve "karpuz kuyusu" adı verilen yerlerde yetiştirilmektedir. Bu kuyular Nisan-Mayıs aylarında Dicle nehrinin çekilmesinden sonra kalan nehir yatağında açılmaktadır. Büyük karpuz yetiştirmek için açılan her kuyu, boyu 2 m, genişliği 60 cm olacak şekilde

hazırlanmaktadır. Kuyuların derinliği ise taban suyuna ulaşılacak derinliğe bağlı olarak değişmektedir ve genellikle taban suyuna 40-60 cm'de ulaşılmaktadır. Diyarbakır karpuzunun iriliğini bu kuyuların hazırlanmasında kullanılan ahır gübresi (koyun ya da keçi gübresi olması tercih edilmektedir), lezzetini ise güvercin gübresi vermektedir. Bu amaç için kullanılan yarasa gübresinin de iyi sonuç verdiği bilinmektedir. Buradan da anlaşılmaktadır ki organik gübrelemenin Diyarbakır karpuzu yetiştiriciliğinde önemi büyüktür. Dicle nehrinin kış aylarında taşıdığı su miktarı artınca karpuz yetiştiriciliği yapılan yerlere kadar nehir genişlemekte çekilirken de bu gübreyi alıp götürmektedir. Yapılan bu gübreleme sonucunda 60-70 kilogram olan karpuzlar yetiştirilmektedir (Pirinç ve Onay 2008, Altaş ve ark. 2011).

3.1.1.1. Diyarbakır'da Yetiştirilen Karpuz Çeşitleri ve Özellikleri

Diyarbakır karpuzları oval alacalı karpuzlar sınıfına girmektedir. Bunlar arasında özellikle sürme, pembe ve ferik adları ile tanınan çeşitler yaygın olarak yetiştirilmektedir (Bayraktar, 1981).

Sürme Çeşidi: Diyarbakır karpuzları arasında en iri olan çeşittir. Kabuk renkleri, koyu yeşil üzerinde uzunlamasına geniş dilimler halinde çizgilidir. Kabuğu kalın ve dayanıklı olduğundan hem nakliyat hem de uzun süreli muhafazaya oldukça elverişlidir. Geleneksel yetiştirme tarzı ile yetiştirildiğinde 50-75 kilogram meyveler elde edilebilmektedir. Bütün meyve olarak yenmesi hemen hemen imkânsız olduğundan çoğunlukla dilimler halinde satılmaktadır. Çekirdekleri yörede yetiştirilen diğer yerli çeşitlere nazaran iri ve siyahtır. Sürme çeşidi "Sürme hırsızı" adıyla da anılmaktadır.

Diğer çeşitlere göre bol lifli olmasından dolayı tıbbi değeri bulunmaktadır. Meyvede suda çözünür kuru madde miktarı (SÇKM) ortalama %10 oranındadır (TPE 2008).

Pembe Çeşidi: Kabuğu parlak yeşil olup üzerine uzunlamasına koyu renkli çizgiler bulunur. Kabuğu 1.5 cm kadar kalındır. Eti pembeye yakın açık kırmızı renkte, hafifçe lifli ve tatlıdır. Çekirdekleri küçük ve siyahtır. Meyvelerde ortalama ağırlık 23-30 kilogram arasındadır.

Ferik Çeşidi: Şekil ve kabuk özellikleri açısından sürme çeşidine benzer fakat, meyveleri daha küçüktür. Ortalama meyve iriliği 8-15 kilogram arasındadır. Eti daha kırmızı, çekirdekleri siyah bazen de sarıdır.

Siyah (Kara Kış) Karpuz: Ağırlığı 5-20 kilogram arasında olup çekirdeği siyahtır. Yörede "siyah kışlık karpuz" adıyla anılmaktadır. Hasattan sonra kış aylarında bahara kadar adi depo şartlarında (hava soğutmalı depo) muhafaza edilmektedir.

Beyaz (Beyaz kış) Karpuz: Kara kış karpuzu gibi kış ayları sonuna kadar saklanabilmektedir. Kabuk rengi hariç tüm özellikleri kara kış karpuzu gibidir (Bayraktar 1981).

3.1.1.2. Diyarbakır Karpuzunun Yoğun Olarak Yetiştirildiği Köyler

Diyarbakır karpuzu, merkeze bağlı ve Dicle nehri kıyısında bulunan şu köylerde yoğun olarak yetiştirilmektedir.

1. Sivritepe (Şeyhelan) Köyü
2. Erimli (Sımakı) Köyü
3. Tekkaynak (Yuvacık) Köyü
4. Feri Köyü
5. Tepe Köyü

3.1.1.3. Diyarbakır Karpuzunun Kullanıldığı Yerler

Bazı ülkelerde karpuzun suyundan fermantasyon ürünü içecek ve şurup yapılmaktadır. Türkiye ve diğer birçok ülkede kabuk ve küçük meyvelerinden (kelek) turşu ve reçel yapılır. %88'i su olan karpuz, tatlı, şifalı, ferahlatıcı bir meyve olup vücuttaki toksinleri temizler ve böbrekteki kumları eriterek sıhhat ve zindelik kazandırır.

Diyarbakır halk hekimliğinde (geleneksel tıp) karpuzun ayrı bir yeri vardır. Yörede karpuzun idrar söktürücü ve böbrek taşlarını düşürücü etkisinin olduğuna inanılmaktadır. Hatta bununla ilgili mani de vardır:

Kavun ye bilege bak
Üzüm ye renge bak
Karpuz ye işegen bak (Güler 1978)

Diyarbakır'ın simgesi haline gelmiş karpuzun tanıtılması, karpuz tarımının kent genelinde yaygınlaştırılması ve üreticilerin desteklenmesi amacıyla her yıl "Kültür ve Karpuz Festivali" düzenlenmektedir.

Yüzyıllardır Diyarbakır'ın adını dünyaya duyuran, ağırlığı zaman zaman 60-65 kilogramı bulan (2014'de yapılan Karpuz Festivali'nde birinci olan Diyarbakır Karpuzu 62.4 kilogram gelmiştir) ünlü Diyarbakır karpuzunun ekonomik olmaması nedeniyle giderek daha az üretildiği ve tüketildiği belirtilmektedir. Ayrıca, geçmişte karpuz yetiştirilmesinde kullanılan ve güvercin gübresi elde etmek için işletilen "Boranhaneler (Koğalar)" artık kalmamıştır.



Resim 3.1.1. Diyarbakır Karpuzu

Diyarbakır karpuzu çeşitleri bakımından ve yetiştirme yöntemleriyle erozyona uğramasının yanında yetiştirme alanı ve yetiştiriciliği bakımından da yok olmaya bırakılmıştır. Giderek azalan Diyarbakır karpuz yetiştiriciliği yerini büyük ölçüde melez çeşitlere bırakmıştır.



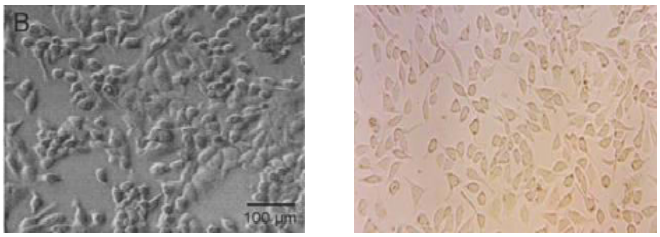
Resim 3.1.2. Diyarbakır karpuzu ve karpuz yetiştiricisi



Resim 3.1.3. Kültür ve Karpuz Festivali'nde sergilenen karpuzlar

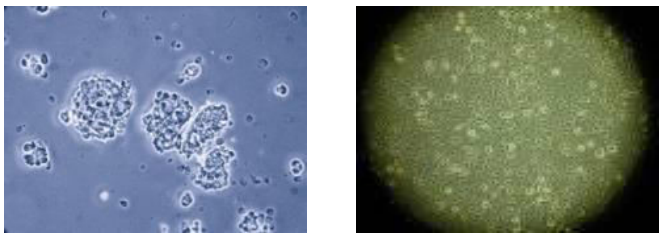
3.1.2. Kullanılan Hücre Hatları

HepG2: İnsan karaciğer karsinoma hücre hattı (Human liver carcinoma cell line) (Resim 3.1.4). American Type Culture Collection (ATCC) No: HB-8065.



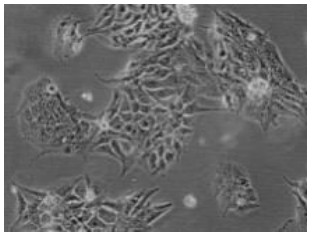
Resim 3.1.4. İnsan karaciğer karsinoma hücre hattı (HepG2)

MCF-7: İnsan meme kanseri hücre hattı (Human breast cancer cell line) (Resim 3.1.5). American Type Culture Collection (ATCC) No: HTB-22.



Resim 3.1.5. İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF-7)

BeWo: İnsan koryokarsinom hücre hattı (Human choriocarcinoma cell line) (Resim 3.1.6). American Type Culture Collection (ATCC) No: CCL-98.



Resim 3.1.6. İnsan koryokarsinom hücre hattı (BeWo)

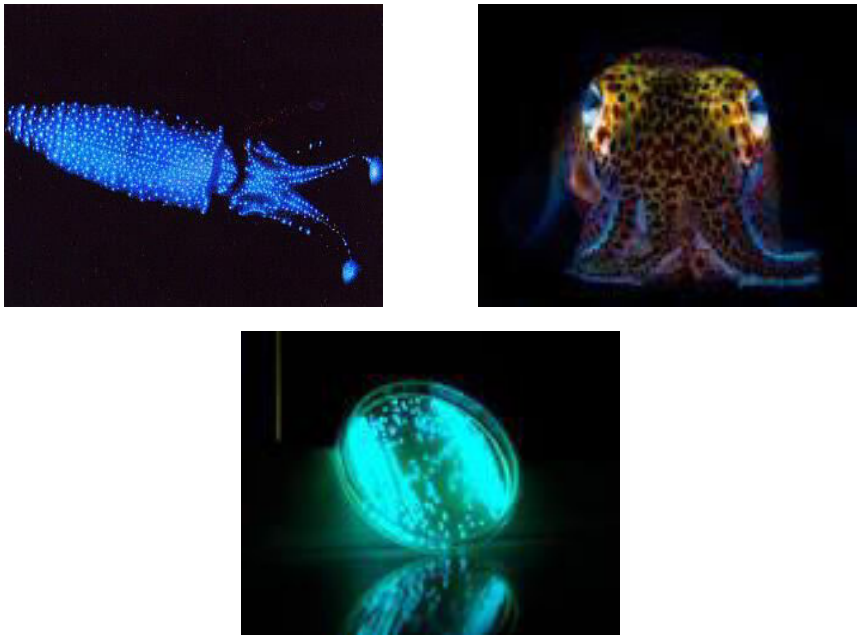
Karpuz suyu liyofilizatının HepG2, MCF-7 ve BeWo hücre hatları üzerine etkisi araştırıldı.

3.1.3. *Vibrio fischeri* Bakterisi

Vibrio fischeri bir deniz bakterisidir. Hem plankton gibi serbest halde hem de lüminesans yapan bazı balıkların veya mürekkep balığının simbiyontu olarak yaşayabilir. Bu bakteriler balıkta veya mürekkep balığında özelleşmiş ışık organlarına yerleşir ve bu organlarda biyolimünesans oluşumuna neden olur (Resim 3.1.7).

Lüminesansın balık veya mürekkep balığı tarafından avın dikkatini çekmek veya kamufle olmak amacıyla kullanıldığı düşünülmektedir. Mürekkep balığı *Euprymna scolopes*'in gece beslenmesi sırasında, ışık organından yayılan lüminesans deniz dibinde zemine yöneltilir ve deniz zemininde mürekkep balığının gölgesini ortadan kaldırmak için ay ışığının şiddetine uyum sağlayacak şekilde ayarlanır.

Lüminesansın kaynağı bizzat bakterilerin kendileridir. Deniz ortamında bakteriler yalnızca ışık organında çoğalarak lüminesans oluştururlar, serbest yüzer haldeyken lüminesans oluşturmazlar. Işık üreten mekanizmanın çok fazla enerji gerektirmesi nedeniyle bakterilerin biyolüminesansı sıkı bir şekilde düzenlemesi için bu durum evrimsel açıdan önemlidir (Nottingham University 2015).



Resim 3.1.7. *V. fischeri* bakterisinin mürekkep balığı ve petri kutusundaki görüntüsü

V. fischeri lüminesans (ışık emisyonu) özelliğinden dolayı bakteriyel toksisite testlerinde kullanılmaktadır.

3.1.4. Wistar Sıçanı

Wistar sıçanı; karşı dölleme (outbred) ile elde edilen bir albino sıçandır. Bu soy biyolojik ve tıbbi araştırmalarda kullanılmak üzere 1906'da Wistar Enstitüsü'nde (Philadelphia, Pensilvanya) geliştirilmiştir. Araştırma laboratuvarlarının öncelikle yaygın olarak ev faresini (Mus musculus) kullandıkları dönemde bir model organizma olarak kullanılmak üzere geliştirilen ilk sıçandır. Bütün laboratuvar sıçan soylarının yarısından fazlası fizyolog Henry Donaldson, bilimsel yönetici Milton J. Greenman ve genetik araştırmacı/embriyolog Helen Dean King tarafından orijinal koloniden oluşturulan sıçanların soyundan gelmektedir.

Wistar sıçanı laboratuvar araştırmaları için halen en yaygın kullanılan canlıdır. Geniş kafası, uzun kulakları ve her zaman vücut uzunluğundan daha kısa bir kuyruğa sahip olmasıyla karakterize edilmektedir (Resim 3.1.8). Sprague Dawley sıçanı ve Long-Evans sıçanları Wistar sıçanlarından geliştirilmiştir (Wikipedia 2015).



Resim 3.1.8. Wistar albino sıçanı

3.1.5. Kimyasal Malzemeler

Gallik asit (3,4,5-trihidroksi benzoik asit), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (ABTS), amonyum molibdat, sodyum arsenit ($Na_2S_2O_3$), Tillman reaktifi (2,6-diklorofenolindofenol), nitrik asit (HNO_3) glasiyel asetik asit, tiyoüre, hidriklorik asit (HCl), etil asetat, n-bütanol, trikloro asetik asit (TCA), sodyum karbonat ($NaCO_3$) etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), troloks, deoksiriboz, sodyum hidroksit (NaOH), agaroz, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, tetrametil etilenediamin (TEMED), tris-baz, tris-HCl, Coomassie parlak mavi R-250 boyası, hidrojen peroksit (H_2O_2), fenol, aluminyum nitrat ($Al(NO_3)_3$), akrilamid/bis-akrilamid, bromofenol blue, glisin, poliakrilamid jel (SDS-PAGE), α-tokoferol, Bradford reaktifi, standart referans materyal (SRM, NIST1573a), MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür], sığır serum albumini (BSA), insan serum albümini (HSA), likopen, dimetil sulfoksit (DMSO), aseton, etanol ve izopropil alkol Sigma-Aldrich'ten ticari olarak temin edildi.

Quercetin dihidrat, ferrozin (3-(2-pridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4"-disülfonik asit sodyum tuzu), 2-tiyobarbitürik asit (TBA), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP), KH_2PO_4 (potasyum fosfat monobazik), K_2HPO_4 (potasyum fosfat dibazik), 2-merkapto etanol ve sodyum (meta)arsenit ($NaAsO_2$) Fluka'dan ticari olarak temin edildi.

Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, potasyum asetat (CH_3COOK), demir-III-klorür ($FeCl_3$), potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$) potasyum persulfat, sülfürik asit (H_2SO_4), ve askorbik asit Merck'ten ticari olarak temin edildi.

Demir-II-klorür ($FeCl_2$), metanol, diklorometan, potasyum iyodür (KI) ve n-hekzan Riedel-de Haen'den, guanidine-HCl Applichem'den, etidyum bromür Amresco'dan, pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) Qiagene'den, HepG2, MCF-7 ve BeWo hücre kültürleri ATCC (American Type Culture Collection)' den, RPMI 1640 medyum, fosfat tampon (PBS), penisilin/streptomisin/fungizon ve tripsin Invitrogen'den temin edildi.

3.1.6. Kullanılan Aletler

Jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Quantity One programı, 4.5.2 versiyonu), yatay DNA elektroforez (Biorad), dikey SDS-PAGE elektroforez (Biorad) güç kaynağı (Biorad-power PAC 3000), UV-visible, Cary 100 spekrometre (Varian), santrifüj (Universal 320R Hettich), liyofilizatör (Christ, Alpha 2-4 LD), Microtox Model 500 analizör (AZUR Environmental, Carlsbad, CA, USA), biyokimya otoanalizör (Roche ISE900 modular P800), ICP-OES (Perkin Elmer OPTIMA 2100 DV), mikrodalga (Speedwave MWS-3, Berghof, Eningen, Germany), HeraCell inkübatör (%5 CO_2), Nikon ters faz consrast mikroskop, ICP-MS, santrifüj (mini spin plus-eppendorf), vorteks (Heidolph), sterilizatör (Heraeus), otoklav (Hirayama-HV-502), çalkalayıcı (Memmert), terazi, pH metre (Mettler Toledo), çeker ocak, vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), membran filtresi (Schleicher&Schuell), blender, -20 derin dondurucu (Sanyo), mikrodalga fırın ve buzdolabı (Arçelik) cihazları ve ekipmanları kullanılmıştır.

3.2. METOTLAR

3.2.1. *İn Vitro* Metotlar

3.2.1.1. Karpuz Suyu ve Liyofilizatın Hazırlanması

Diyarbakır karpuzu (*C. lanatus* cv. "Sürme") çeşme suyu ile iyice yıkanıp kurulandı, ağırlığı tartıldı. Bıçak yardımı ile kesilip dilimlendikten sonra bu dilimlerin kabukları soyuldu. Karpuzun meyve kısmı çekirdeklerinden arındırılıp derin bir küvette küçük parçalar halinde doğrandı. Doğranan karpuz dilimlerinin bir kısmı liyofilize edilmek üzere ayrıldı, geri kalanı ise elle yoğrulmak suretiyle ezilip suyu çıkarıldı (Resim 3.2.1.1). Temiz patiska bezi yardımıyla süzülüp pH'sı ölçüldükten sonra deney amaçlı kullanılmak üzere uygun hacimlerde dondurucuya (-20 ^{o}C) bırakıldı. Hazırlanan karpuz suyunun bir kısmı da liyofilizatörde kurutulduktan sonra tartımı alınıp aynı amaçla -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

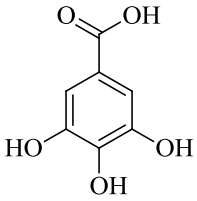


Resim 3.2.1.1. Karpuz suyu ve liyofilizatının hazırlanması

3.2.1.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Dicle Nehri kıyısında yetişen Diyarbakır karpuz suyu ve karpuz suyu liyofilizatında bulunan toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocaltaeu Reaktifi (FCR) ile Slinkard ve Singleton (1977) yöntemine göre tayin edildi. Gallik asit standart fenolik bileşik olarak kullanıldı (Şekil 3.2.1.1).

Fenolik bileşikler antioksidan aktivite gösterirler. BHT, kuersetin (quercetin), α-tokoferol ve gallik asit önemli fenolik bileşiklerdir.



Şekil 3.2.1.1. Gallik asit molekül yapısı

Folin-Ciocaltaeu yönteminde kullanılan fenol reaktifi fenol içermemektedir, fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asit karışımı halinde bulunur (Wikipedia 2015). Folin daha çok fenoller ve fenolik olmayan indirgeme maddeleri ile spektrofotometrik olarak tayin edilebilen kromojen oluşturmak amacıyla tepkimeye girer. Kromatografide sprey reaktifi olarak da kullanılır. Bazik pH'da fosfomolibdik/fosfotungstik asit kompleksleri elektron transferine bağlı olarak indirgenir, içindeki metalin daha düşük değerliğe sahip olduğu kromojenler oluşur (Sigma-Aldrich 2015).

Folin : $H_3PW_{12}O_4$ / $H_3PMo_{12}O_{40}$ (molibdofosfotungstik heteropoli asit)

$$\text{Mo (VI) (sarı)} + e^- \text{ (AH)} \longrightarrow \text{Mo (V) (mavi)} \quad \lambda max = 765 \text{ nm} \qquad (10)$$

Folinde aktif merkez Mo(VI)'dir. Antioksidan (AH)'ın bir elektron vermesiyle $Mo(VI)_{sarı}$ $Mo\ (V)_{mavi}$'e indirgenir.

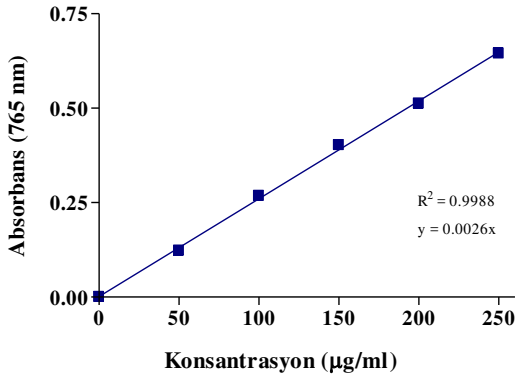
Folin-Ciocaltaeu metodunu kullanmamızdaki amaç; gallik asidin artan konsantrasyonuna karşı absorbans grafiğinden elde edilen standart eğriden yararlanarak karpuz suyu ve liyofilizat içindeki toplam fenolik bileşen miktarını gallik aside eşdeğer olarak hesaplamaktır.

Gallik asidin etanol içindeki 0.5 mg/ml'lik stok çözeltisinden 50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml'lik çözeltiler hazırlandı. Deney ortamına sırasıyla 40 µl gallik asidin farklı konsantrasyonları/ karpuz suyu/ liyofilizat (distile su ile hazırlandı, 10 mg/ml) çözeltisi konuldu, hacim saf su ile 1200 µl'ye tamamlandı. Ardından, 2N folin reaktifinden 200 µl eklenip iyice çalkalandı ve oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk bekletildikten sonra üzerine 600 µl %20'lik Na_2CO_3 çözeltisi eklendi, iyice karıştırıldı, 25 ^oC'lik su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometre cihazında 765 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Gallik asidin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.2.1.2). Standart eğri çizilerek $R^2 = 0.9988$ değeri ve aşağıdaki denklem elde edildi (Denklem 1).

Absorbans (A) = 0.0026 x gallik asit (µg) (1)

Bu denklem kullanılarak karpuz suyu ve liyofilizat çözeltisinin toplam fenolik bileşen miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı (Tablo 4.1.1).



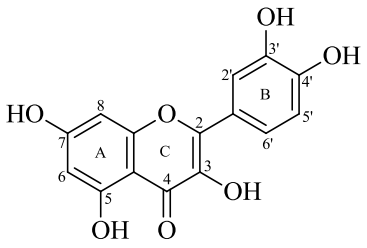
Şekil 3.2.1.2. Standart gallik asit grafiği

3.2.1.3. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

Dicle Nehri kıyısında yetişen Diyarbakır karpuz suyu ve liyofilizatında bulunan toplam flavonoid bileşen miktar tayini flavonoid-alüminyum kompleks oluşumuna dayanarak Moreno ve ark. (2000) tarafından geliştirilen yöntem ile tayin edildi. Standart bileşik olarak quercetin kullanıldı (Şekil 3.2.1.3).

Flavonoidler, "doğanın biyolojik yanıt düzenleyicileri"olarak anılırlar. Bunun nedeni, kanıtlanmış anti-inflamatuvar, anti-alerjik, anti-viral ve anti-kanserojenik özellikleri ile alerjenler, virüsler, karsinojenler gibi diğer bileşiklere karşı vücudun yanıtını düzenleme yeteneğine sahip olmalarıdır. İlaveten, oksidatif stres ve serbest radikal hasarına karşı belirgin koruma sağlayan güçlü antioksidanlardır.

Kullanılan standart flavonoid bileşik quercetinin A halkasındaki 5-hidroksil grubu ve C halkasındaki 3-hidroksil ve 4-karbonil grubu ortam ve pH'ya bağlı olarak metal iyonlarıyla ana kompleks oluşturma noktalarıdır. B halkasındaki 3' ve 4' OH grupları asidik ortamda Al(III) ile kompleks oluşturmazlar (Maalesef ve Kuntıc 2007).



Şekil 3.2.1.3. Quercetin molekül yapısı

Bu yöntemdeki amaç; quercetinin artan konsantrasyonuna karşı absorbans değerlerini grafiğe geçirip R^2'yi bulmak, buradan yola çıkarak karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan toplam flavonoid bileşen miktarını quercetine eşdeğer hesaplamaktır.

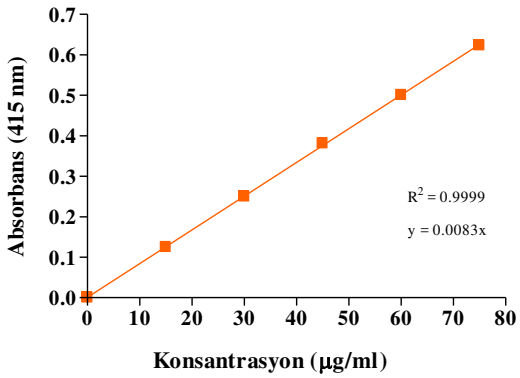
Quercetinin metanol içindeki 100 µg/ml'lik stok çözeltisinden 15, 30, 45, 60 ve 75 µg/ml'lik çözeltiler hazırlandı. Deney ortamına sırasıyla; 0.1 ml %10 $Al(NO_3)_3$, 0.1 ml 1M CH_3COOK ve 3.8 ml metanol bırakıldı, ardından 1 ml quercetin veya 1 ml karpuz suyu / liyofilizat çözeltisi (10 mg/ml) eklendi karışım iyice karıştırıldıktan sonra

25 ^{o}C su banyosunda 40 dk inkübasyona bırakıldı. Ortamda bulunan flavonoid miktarına bağlı olarak sarı renk şiddeti gözlendi. Absorbans ölçmeden önce liyofilizat ve karpuz suyu numuneleri 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. UV-VIS spektrofotometresinde 415 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Quercetinin artan konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi, standart eğri çizilerek R^2= 0.9999 değeri ve aşağıdaki denklem elde edildi (Denklem 2, Şekil 3.2.1.4).

Absorbans (A) = 0.0083 x quercetin (µg) (2)

Bu denklem kullanılarak numunelerdeki toplam flavonoid bileşen miktarı quercetin eşdeğeri (QUE) olarak hesaplandı (Tablo 4.1.1)



Şekil 3.2.1.4. Standart quercetin grafiği

3.2.1.4. Likopen Tayini

Diyarbakır karpuzunun likopen içeriği Fish ve ark. (2002)'nın geliştirdiği metoda göre spektrofotometrik olarak 503 nm'de tayin edildi. Yaklaşık 0.6 g taze karpuz suyu ve karpuz suyu liyofilizatı 50 ml'lik birer erlenin içine bırakıldı. Deney ortamına sırasıyla %0.05 BHT içeren 5 ml saf aseton, 5 ml %95'lik etanol ve 10 ml hekzan eklenip 1 dk çalkalandı. Bu karışım buz banyosuna bırakılıp orbital çalkalayıcı yardımıyla 20 dk karıştırıldıktan sonra 3 ml deiyonize su eklenip 5 dk daha karıştırılmaya devam edildi. Bu işlemin sonunda karışım 5 dk bekletilip faz ayırımı

gözlendi. Hekzan fazı (üst faz) kuvarz küvet kullanılarak UV-vis spektrometrede absorbansı ölçüldü, hekzan kör olarak kullanıldı.

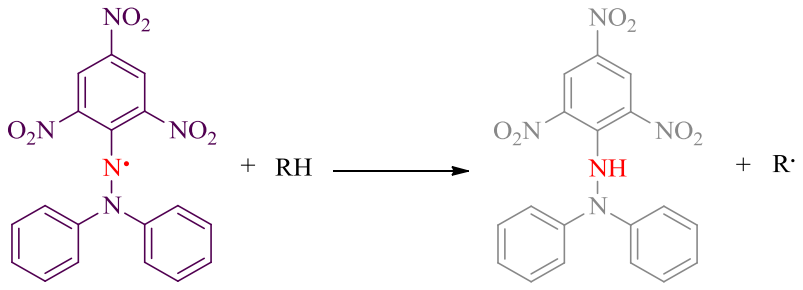
Likopen içeriği aşağıdaki denkleme göre mg/kg karpuz dilimi veya liyofilizat olarak hesaplandı (Denklem 3, Tablo 4.1.1).

$$\text{Likopen içeriği (mg/kg)} = A_{503} \times 31.2/g \qquad (3)$$

3.2.1.5. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Karpuz suyu ve liyofilizatının serbest radikal söndürme aktivitesi Blois (1958) metodu ile tayin edildi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı.

DPPH metodu, antioksidan aktiviteyi tayin etmek için kullanılan en eski testtir, ilk olarak 1950'de doğal materyallerdeki H-donörlerini tespit etmek için önerilmiştir. Sonraları hem fenoliklerin hem de yiyeceklerin biyolojik açıdan önemli kısımlarının antioksidan potansiyelini tayin etmek için kullanılmıştır. DPPH testi kararlı serbest radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilin fenoliklerdeki H-donörleri ile tepkime kapasiteleri temeline dayanmaktadır. DPPH görünür bölgede (517 nm) oldukça şiddetli absorbsiyon verir, böylece UV-VIS spektroskopi ile kolayca tespit edilebilir (Roginsky ve ark. 2005).



Şekil 3.2.1.5. DPPH molekülünün antioksidan varlığında indirgenmesi

Antioksidan molekül ile DPPH arasındaki tepkimede DPPH'in ortamdaki derişiminin azalmasına bağlı olarak 517 nm'deki absorbansın düşmesine neden olur. Sonuç olarak, oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H'tır (Şekil 3.2.1.5). Bu olay reaksiyon karışımının renginin mordan sarıya dönmesiyle gözlenmektedir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan karpuz suyu 0.45 µm steril filtre ile süzüldü. Tepkime ortamına sırasıyla; metil alkolde hazırlanan 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml alınarak farklı deney tüplerindeki 3 ml farklı derişimlerdeki karpuz suyu (5-15-25-50-100-150 µl/ml), liyofilizat ile pozitif kontrol (5-15-25-50-100-150 µg/ml) çözeltilerine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk bekletildi. Liyofilizat çözeltilerinin absorbansı ölçülmeden önce 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Deney ortamında artan madde konsantrasyonuna bağlı olarak mordan sarıya dönüşen renk şiddeti izlendi. Spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Bu teste göre daha düşük absorbans daha yüksek aktivite anlamına gelmektedir. Aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilen sonuçlardan % DPPH radikalini söndürme aktivitesi hesaplandı (Denklem 4, Tablo 4.1.2, Şekil 4.1.2).

$$\text{DPPH radikalini söndürme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1 / A_0) \text{ x } 100] \quad (4)$$

A_0 = Negatif kontrol numunesinin (DPPH) absorbansı

A_1 = Numunenin (karpuz suyu, liyofilizat, pozitif kontrol) absorbansı

3.2.1.6. ABTS Radikal Katyonu Kullanarak Serbest Radikal Süpürme Etkisi

Karpuz suyu ve liyofilizatın serbest radikal süpürme etkisi ABTS radikal katyonun renksizleştirilmesi deneyi ile belirlendi (Kumar ve Chattopadhyay 2007). ABTS çözeltisi (7 mM, renksiz) ve potasyum persulfat çözeltisi (2.45 mM, turkuaz rengi) distile suda hazırlanıp karıştırıldı (1:1, v/v). ABTS stok çözeltisine potasyum persulfat eklenince ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\cdot+}$) oluşur (Şekil 3.2.1.6). Bu karışım kullanılmadan önce oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletildi (mavi-yeşil renk oluştu). ABTS ve potasyum persülfat stokiyometrik olarak 1:0.5 (mol/mol) oranında etkileşirler, bunun sonucu olarak ABTS eksik oksidasyona uğrar. Tepkime ortamında ABTS'nin oksidasyonu hemen başlar fakat 6 saatten önce absorbans maksimum değere ulaşmaz ve oluşan radikal kararlı değildir. Radikal oda sıcaklığı ve karanlıkta iki günden daha uzun süre kararlıdır (Pham-Huy ve Pham-Huy 2008). Stok çözeltiyi kullanmadan önce, 734 nm'de 0.70 (± 0.02) absorbans değerine ulaşacak şekilde etanol ile seyreltildi. Çözelti 30 ^{o}C'de 6 dk bekletildikten sonra dengeye ulaştı. Seyreltilmiş

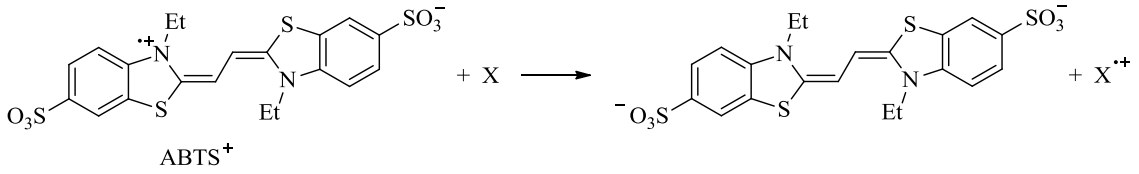
ABTS çözeltisinden 1.9 ml alınıp karpuz suyu (5, 15, 25, 50, 100 µl), liyofilizat ve pozitif kontrollerin (5, 15, 25, 50, 100 µg/ml) farklı konsantrasyonlarından 100 µl ile karıştırıldı, 6 dk karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm'de absorbans ölçüldü. Troloks, askorbik asit, quercetin ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı (Denklem 5, Tablo 4.1.3, Şekil 4.1.3).

Numunelerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

ABTS radikal katyonu söndürme aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$ (5)

A_0 = Negatif kontrol numunesinin (ABTS) absorbansı

A_1 = Numunenin (karpuz suyu, liyofilizat, pozitif kontrol) absorbansı



Şekil 3.2.1.6. ABTS radikal katyonunun antioksidan varlığında indirgenmesi

3.2.1.7. İndirgeme Gücü

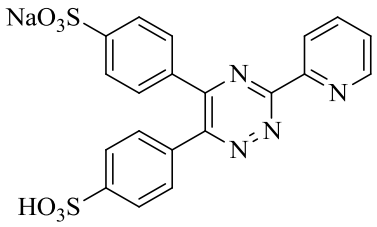
Fenton tipi tepkimelerde Fe^{2+} ile hidrojen peroksit tepkimeye girerek hidroksil radikalini oluştururken demir Fe^{3+}'e yükseltgenir. OH radikalinin oluşumu lipid peroksidasyonuna, protein modifikasyonuna ve DNA hasarına yol açar. Karpuz suyu liyofilizatı varlığında Fe^{3+}/Fe^{2+}'ye dönüşümü Oyaizu metodu (1986) ile incelendi. BHA, BHT ve α-tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Deney ortamına farklı test tüplerine sırayla 1 ml liyofilizat ve pozitif kontrol çözeltileri eklenip, üzerine 2.5 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 ml potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] (%1, w/v) eklenerek bunlar iyice karıştırıldı ve 50 ^oC'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu karışıma daha sonra 2.5 ml trikloroasetik asit (TCA, %10 w/v) ilave edilip iyice çalkalandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant tabakadan 2.5 ml alınıp üzerine sırayla 2.5 ml distile su ve 0.5 ml $FeCl_3$ çözeltisi (%0.1, w/v) ilave edildikten sonra karışım iyice karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra artan

konsantrasyonla birlikte sarıdan yeşile dönüşen renk gözlendi, 700 nm'de absorbans ölçüldü (Tablo 4.1.4, Şekil 4.1.4).

Bu testte yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir.

3.2.1.8. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesi metodu, Fe^{2+} iyonlarının ferrozin reaktifi tarafından tutulmasına dayanmaktadır. Bu metotda ferrozin Fe^{2+} iyonlarıyla kompleks oluşturur. Bu kompleks oluşumu metal şelatlayıcı ajanlar varlığında bozulur ve sonuç olarak Fe^{2+}-ferrozin kompleksi indirgenir. Bu testte, hem flavonoid antioksidanlar hem de standart bileşikler ferrozin reaktifi ile demirli kompleksin oluşumuna engel olurlar. Bunlar şelatlama aktivitesine sahip olup Fe^{2+} iyonlarını ferrozinden önce yakalarlar ve inert Fe^{2+}-ekstrakt/ fraksiyon komplekslerini oluştururlar (Laguerre 2007, Singh ve ark. 2007, Habtemariam 2007). Fe^{2+}-ferrozin kompleks bileşiğinin indirgenmesine bağlı olarak test ortamındaki mor renk açık sarıya dönüşür. 562 nm dalga boyunda artan derişimle azalan absorbans değerleri elde edilir. Şekil 3.2.1.7'de ferrozin molekülü verilmektedir.



Şekil 3.2.1.7. Ferrozin molekülü

Karpuz suyu ve liyofilizatın metal şelatlama aktivitesi Dinis ve ark. (1994)'nın metodu ile ölçüldü. Güçlü şelatlama aktivitesine sahip olan EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Deney ortamına sırasıyla karpuz suyu, liyofilizat ve EDTA'nın farklı derişimlerdeki çözeltilerinden 1 ml ve 2 mM $FeCl_2$'den 50 µl ilave edilip karıştırıldıktan sonra 200 µl 5 mM ferrozin çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı sonra oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk bekletildi. Artan konsantrasyona bağlı olarak azalan viyole renk şiddeti izlendi. UV-VIS spektrofotometre cihazında 562 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Aşağıdaki denklem kullanılarak Fe^{2+}-ferrozin kompleksinin elde edilen inhibisyon değerleri hesaplandı (Denklem 6, Tablo 4.1.5).

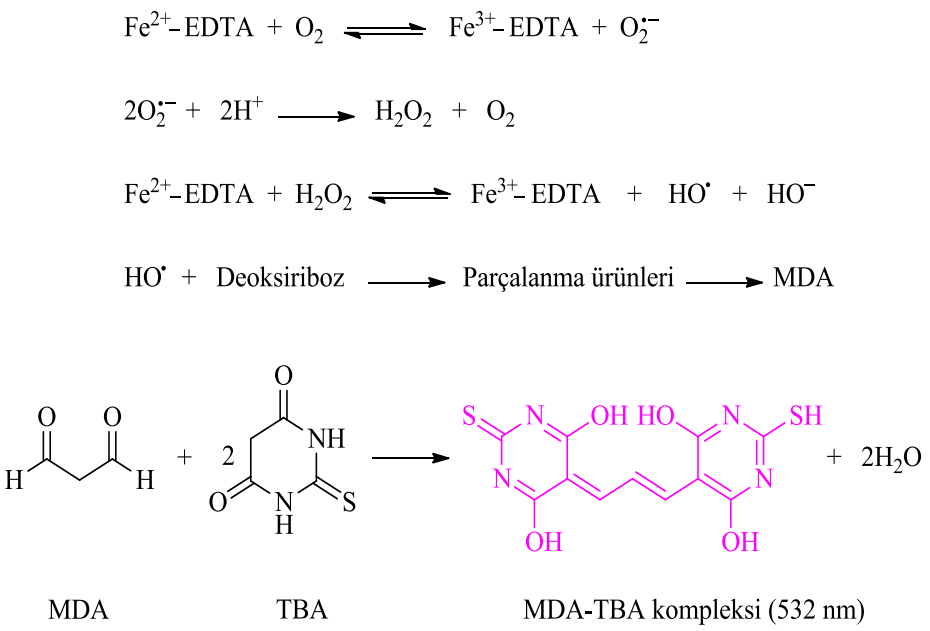
Metal şelatlama aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$ (6)

A_0 = Negatif kontrol numunesinin absorbansı

A_1 = Numunenin absorbansı

3.2.1.9. Hidroksil Radikalini Söndürme Aktivitesi

Diyarbakır karpuz suyunun hidroksil radikalini söndürme aktivitesi deoksiriboz metodu ile Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde göre incelendi. Bu yöntem bazı eşitliklere dayanmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboza saldırır, bir dizi reaksiyon sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Oluşan MDA, TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli ve 532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini meydana getirir (Kumar ve Chattopadhyay 2007) (Şekil 3.2.1.8).



Şekil 3.2.1.8. Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu

Karpuz suyunun hidroksil radikalini söndürme etkisini araştırmak amacıyla tepkime ortamına sırasıyla; 100 µl 1 mM EDTA, 10 µl 10 mM $FeCl_3$, 100 µl 50 mM H_2O_2, 360 µl 10 mM deoksiriboz, 1 ml numune, 330 µl 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu

ve 100 µl 1 mM askorbik asit eklendi. Karışım 37 ºC'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 1 ml alınıp üzerine 1 ml %10'luk TCA ve 1 ml %0.5'lik TBA (0.025 M NaOH içinde %0.025 BHA içerecek şekilde hazırlandı) ilave edildi. Daha sonra 100 ºC'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Karışım buzda soğutulduktan sonra 532 nm'de UV spektroskopide absorbansı ölçüldü. Ayrıca, tepkime ortamında kullanılan karpuz suyu kadar numuneye (kör) aynı işlemler uygulanıp absorbanstan çıkarıldı. Negatif kontrol, sadece numune içermeyen test örneğidir. % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Denklem 7).

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\ ((A_{\text{n.kontrol}} - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}})) / A_{\text{n.kontrol}}\ ] \times 100 \qquad (7)$$

3.2.1.10. Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesi

Karpuz suyu (50-1000 µl/ml) ve liyofilizatın artan konsantrasyonlardaki (50-1000 µg/ml) hidrojen peroksit süpürme etkisi titrasyon ile Zhao ve ark. (2006)'nın metoduna göre ölçüldü. Askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı. 50 ml'lik erlene 1 ml numune ve 1 ml H_2O_2 (0.1 mM) çözeltisi alınıp üzerine sırasıyla; 100 µl amonyum molibdat (%3, yaklaşık 2 damla), 10 ml H_2SO_4 (2 M) ve 7 ml KI (1.8 M) ilave edilip karıştırıldı. Bu karışık çözelti sarı renk kaybolana kadar $Na_2S_2O_3$ (5 mM) ile titre edildi. Yüzde (%) hidrojen peroksit süpürme aktivitesi aşağıda belirtildiği gibi hesaplandı (Denklem 8, Tablo 4.1.7, Şekil 4.1.7).

$$\text{Hidrojen peroksit süpürme aktivitesi (\%)} = [(V_0 - V_1) / V_0] \times 100 \qquad (8)$$

V_0: Kontrol numunesinin titrasyonu için kullanılan $Na_2S_2O_3$ çözeltisinin hacmi

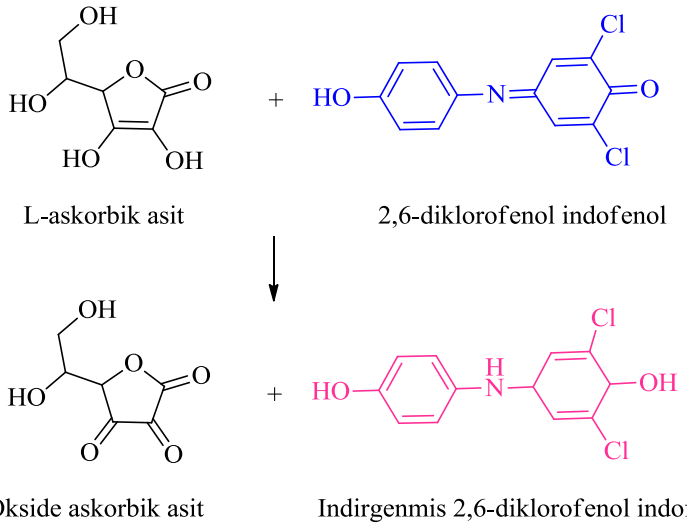
V_1: Karpuz suyu, liyofilizat veya askorbik asit numunesinin titrasyonu için kullanılan $Na_2S_2O_3$ çözeltisinin hacmi

3.2.1.11. Vitamin ve Şeker Tayini

Karpuz suyu ve liyofilizatın A, D ve E vitaminleri ile fruktoz, glukoz ve sukroz analizi için numune hazırlama prosedürü Perales ve ark. (2005)'nın metoduna göre yapılıp, analizleri Kienen ve ark. (2008)'nın HPLC (Lab Alliance) yöntemi ile gerçekleştirildi. Numunelerin kromatografiye hazırlama işleminde ilk olarak, 5 ml karpuz suyu ve 5 g liyofilizat 50 ml'lik ayrı erlenlere bırakıldı, üzerine 0.5 g askorbik asit ile 13 ml KOH-etanol çözeltisi (10 ml etanol 3 ml %60 KOH (w/v) içinde çözünerek hazırlandı) ilave edildi. Numuneler, oda sıcaklığında bir gece magnetik karıştırıcı yardımı ile çalkalandı. Daha sonra, ayırma hunisine alınıp üzerine 5 ml hekzan ilave edilerek 5 dk çalkalandı. Organik faz ayrıldıktan sonra ayrı bir erlenmayere aktarıldı ve hekzan ile ekstraksiyon işlemi iki defa daha tekrarlandı. Toplanan organik fazlar birleştirilip yeni birer ayırma hunisine alındı ve ikişer defa 5 ml distile su ile yıkandı. Ayrılan organik fazlar birleştirilerek 40 ^{o}C'de rotary evaporatör yardımı ile çözücüsü tamamen uçuruldu. Ekstraksiyon işlemi ile elde edilen maddeler 5'er ml metanol ile çözülerek 0.45 μm steril membran filtre ile süzülüp sırasıyla kromatografi sistemine enjekte edildi. Bütün işlemler için numuneler direk ışıktan korunarak oda sıcaklığında gerçekleştirildi (Tablo 4.1.8).

3.2.1.12. C Vitamini Tayini

Karpuz suyu ve liyofilizatın C vitamini içeriği Tillman reaktifine (2,6-diklorofenolindofenol) karşı (mg askorbik asit/ml karpuz suyu) titrasyonla tayin edildi (Contreras-Calderon ve ark. 2011) (Şekil 3.2.1.9). Standart madde olarak askorbik asit, pozitif kontrol olarak taze limon suyu kullanıldı. Standart askorbik asit çözeltisi %5'lik TCA çözeltisi ile konsantrasyonu 0.005 M olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan Tillman reaktifi bir bürete doldurulduu, 10 ml standart askorbik asit çözeltisi, karpuz suyu, liyofilizat çözeltisi (50 mg/ml), pozitif kontrol ve negatif kontrol (çözücü, distile su) farklı erlenmayerlere bırakıldı. Sırasıyla tüm numunelere dönüm noktasına kadar yavaş yavaş Tillman reaktifi damlatıldı. Her birinin dönüm noktasında harcanan Tillman reaktifine bağlı olarak C vitamini içeriği hesaplandı. Sonuçlar mg askorbik asit ekivalent/ml karpuz suyu, mg askorbik asit ekivalent/ml limon suyu ve mg askorbik asit ekivalent/ g liyofilizat olarak verildi (Tablo 4.1.9).



Şekil 3.2.1.9. Tillman reaktifinin askorbik asit ile indirgenmesi tepkimesi

3.2.1.13. Element Analizi

ICP-OES Cihazı ile Element Analizi

Karpuz suyu ve liyofilizatın element analizi için örneklerden 5 ml alınarak bir beher içerisinde üzerine 5 ml HNO_3 eklenerek kuruluğa yakın buharlaştırıldı. Elde edilen kalıntı üzerine 6 ml 1:1 (v/v) oranında HNO_3-H_2O_2 eklenerek mikrodalga için kullanılan teflon kaplara aktarılıp çözünürleştirilmesi sağlandı. Mikrodalga (Speedwave MWS-3, Berghof (Eningen, Germany) ile çözünürleştirilen örneklerdeki element (Ca, Se, Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, Ni, Cd) analizleri ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Perkin Elmer OPTIMA 2100 DV) cihazı ile yapıldı (Tablo 4.1.10.1).

ICP-MS Cihazı ile Element Analizi

Liyofilize edilmiş karpuz suyu örneklerinin element içeriğini tayin etmek için yaklaşık 0.5 g liyofilizat mikrodalga numune kabına yerleştirildi. Örneklere 5 ml HNO_3 eklendikten sonra numuneler mikrodalga cihazında 165 ^{o}C'de ve 180 ^{o}C'de 15'er dk çözünürleştirme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra numuneler, çeker ocak kabini içinde 50 ml'lik erlenlere aktarıldı. Daha sonra, her bir mikrodalga numune kabı 1 ml %5 HNO_3 ile 3'er defa yıkanıp ilk numune ile birleştirildi. Bundan sonra, 5 ml ultra saf

su eklenip ısıtıcı yardımıyla yaklaşık 3 ml kalana kadar çözücüsü uçuruldu. 0.45 µm membran filtre ile süzüldükten sonra steril falkon tüplerine aktarılan numuneler ultra saf su ile 25 g'a tamamlandı (Perales ve ark. 2005). Element (Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Se, Al, As, Pb, Ni, Cd, Cr, Sr, Ba, V, U) analizleri ICP-MS cihazı ile yapıldı (Tablo 4.1.10.2-4).

3.2.1.14. Protein Miktar Tayini

Standart Bradford Deneyi

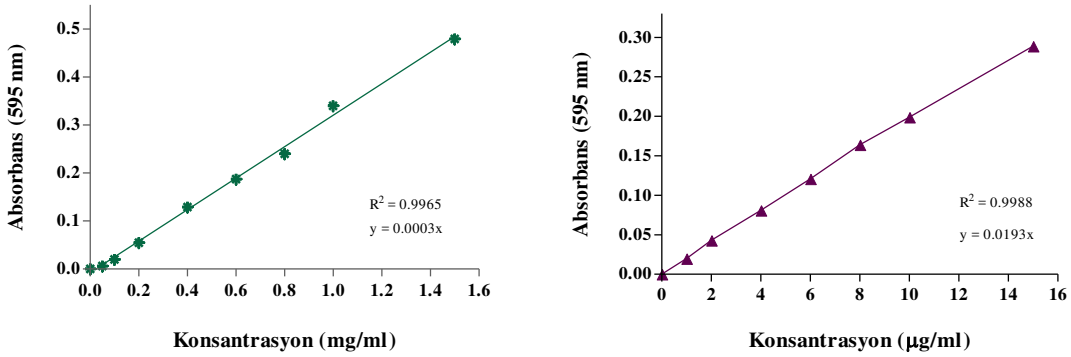
Liyofilizatta bulunan protein miktarı standart bradford metodu ile spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (Bradford 1976). Stok HSA (insan serum albümini) çözeltisi 2 mg/ml konsantrasyonda distile su ile hazırlandı. Stoktan 50-1500 µg/ml'lik seri çözeltiler elde edildi. Liyofilizat çözeltisi 10 mg/ml olarak hazırlandı. Deney ortamına sırayla 1 ml Bradford çözeltisi ve 20 µl numune eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. 595 nm'de absorbans ölçüldü. HSA'nın artan konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği (Şekil 3.2.1.10) çizilerek elde edilen standart eğriden yararlanarak liyofilizat içindeki protein miktarı µg seviyesinde HSA'ya eşdeğer olarak hesaplandı (Denklem 9, Tablo 4.1.11).

Absorbans (A) = 0.0003 x HSA (mg) (9)

Mikro Bradford Deneyi

Liyofilizatta bulunan protein miktarı mikro bradford metodu ile spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (Bradford 1976). Standart olarak HSA kullanıldı. Stok HSA çözeltisi 100 µg/ml konsantrasyonda distile su ile hazırlandı. Stoktan 1-15 µg/ml'lik seri çözeltiler elde edildi. Liyofilizat çözeltisi 10 mg/ml olarak hazırlandı. Deney ortamına sırayla 1 ml Bradford çözeltisi ve 1 ml numune eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. 595 nm'de absorbans ölçüldü. HSA'nın artan konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği (Şekil 3.2.1.10) çizilerek elde edilen standart eğriden yararlanarak liyofilizat içindeki protein miktarı µg seviyesinde HSA'ya eşdeğer olarak hesaplandı (Denklem 10, Tablo 4.1.11).

Absorbans (A) = 0.0193 x HSA (µg) (10)



Şekil 3.2.1.10. İnsan serum albümininin (HSA) A. Standart bradford metodu ve B. Mikro bradford metoduna göre standart grafikleri

3.2.1.15. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Karpuz suyu liyofilizatının sığır serum albümininin (BSA) oksidatif hasarı üzerine etkisi Wang metodu kullanılarak SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) (%30 poliakrilamid/bisakrilamid) ile belirlendi (Laemmli 1970). BSA oksidasyonu Fenton reaksiyonu ile gerçekleştirildi. Liyofilizat ve BHT'nin 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/ml konsantrasyonları, potasyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7.4), BSA (2 mg/ml, tamponda hazırlandı), $FeCl_2$ (1.0 mM), EDTA (1.0 mM) ve H_2O_2 (2.0 mM) içeren reaksiyon karışımı (1.2 ml), 3 saat 37 ^oC'de inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 25 µl alınıp 25 µl sample buffer ile karıştırıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dk kaynatıldı.

SDS-PAGE jel elektroforezi yürütme ortamı %10 alt jel (resolving gel) ve %4 üst jel (stacking gel) olmak üzere iki kısımdan oluşturuldu.

Alt jel için; küçük bir beherde sırasıyla 4.1 ml distile su, 3.3 ml %30 poliakrilamid/bisakrilamid), 2.5 ml 1.5 M pH 8.8 tris-HCl tamponu ve 100 µl %10 SDS karıştırılıp degassing (gazını alma) işlemi yapıldı. Daha sonra 50 µl %10 amonyum persülfat ve 5 µl TEMED karışıma eklendi. Hazırlanan bu karışım mikropipetle cam tabakaların kenarından dikkatli ve seri bir şekilde yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra polimerleşmenin düzgün olması için dikkatli bir şekilde en üste distile su ilave edilip yarım saat beklendi.

Üst jel şöyle oluşturuldu; küçük bir beherde sırasıyla 6.1 ml distile su, 1.3 ml %30 poliakrilamid/bisakrilamid, 2.5 ml 0.5 M pH 6.8 tris-HCl tamponu ve 100 µl %10 SDS karıştırılıp degassing işlemi yapıldı. Daha sonra 50 µl %10 amonyum persülfat ve 10 µl TEMED karışıma eklendi.

Alt jelin polimerleşmesi gerçekleştikten sonra distile su döküldü ve cam tabakalar arasına tarak yerleştirildi. Hazırlanan üst jel dikkatli bir şekilde yüklendi. Polimerleşme gerçekleştikten sonra tarak çıkartıldı, oluşan kuyucuklar distile su ve tamponla yıkandı. Hazırlanan numunelerden 10 µl alınıp her bir kuyucuğa yüklendi.

Numuneler, BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak her jel için 35 mAmp ve 500 volt'da yürütücü tampon (running buffer) içinde (tris-HCl, glisin, SDS) BioRad tankında 1 saat yürütüldü. Bu işlemin sona ermesiyle jeller %1'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 1 saat süreyle renklendirildikten sonra boya çıkarma solüsyonu (su:metanol:glasiyel asetik asit, 6:3:21, v:v:v) içinde 45-60 dk bekletilerek boya uzaklaştırıldı.

Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması

Protein hasarının miktarını ve band yoğunluğunu belirleme işlemi jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı (Gel-Doc-XR; BioRad, Hercules, CA, USA). Jeller üzerindeki bantların yoğunluğu Quantity One Programme sistemiyle ölçüldü (version 4.5.2, BioRad). Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grupla standardize edildi. Sonuçlar 3 farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi (Şekil 4.1.12.1-2).

3.2.1.16. 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. Agaroz jel elektroforezi tekniği; 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 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.

Hidrojen peroksidin UV ile etkileşmesi sonucu oluşan hidroksil radikalinin pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Karpuz suyu liyofilizatının 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/ml derişimlerde DNA'yı OH radikaline karşı koruma etkisine bakıldı. Pozitif kontrol olarak BHA ve BHT kullanıldı.

Agaroz (1.0 g) 100 ml tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2) ilave edilip mikrodalga fırında yaklaşık 2.5 dk kaynatıldı. Mikrodalgadan alınıp yaklaşık 60 ^{o}C'ye soğutulduktan sonra 1.5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış cam tabakaya düz zeminde döküldü. Çözelti üzerinde hava kabarcığı kontrolü yapıldıktan sonra tarak yerleştirilerek jelin donması için oda sıcaklığında 40-45 dk bekletildi.

Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel 200 ml tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 120 V'ta 500 mA akım uygulanarak 80 dk süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildi, kablo bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı BioRad Gel-Doc-XR görüntüleme sistemi ile çekildi. Jeller üzerindeki bant yoğunlukları Quantity One Programme sistemiyle belirlendi (version 4.5.2, BioRad). Belirlenen her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grupla standardize edildi. Sonuçlar 3 farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi.

Karpuz suyu liyofilizatının supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkileri % inhibisyon olarak verildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Fukuhara ve Miyata 1998), (Denklem 11, Şekil 4.1.13).

$$\% \text{ İ} = 1-[\ (S_{k+m} - S_c) / (S_k - S_c)\ ] \qquad (11)$$

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

Plazmid DNA Saflaştırma

DNA kesimini incelemenin bir yolu supercoiled DNA'nın (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I), open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) veya linear (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III) forma dönüşümünü incelemektir. Agaroz jel elektroforezinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla, hacmi 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 (Emen Tanrıkut ve ark. 2013). Çalışmada kullanılan pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2 kb) Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın saflığına hem elektroforez hem de UV spektroskopisinde 260/280 nm absorbanslarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorbans ölçümü ile hesaplandı (50 μg/ml için A_{260}=1.0).

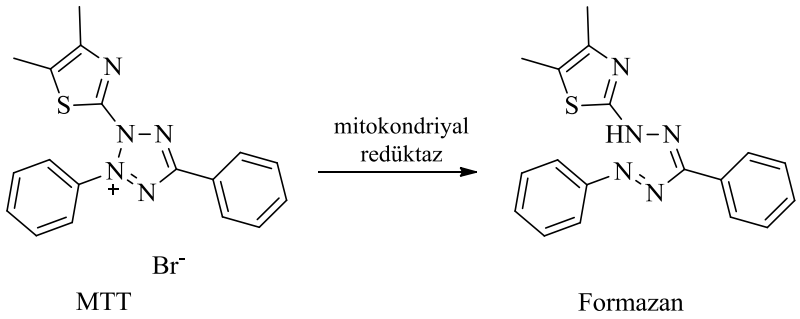
3.2.2. Hücre Canlılığı Çalışmaları

3.2.2.1. Hücre Kültürleri

Hücre kültürleri 37 ^{o}C ve %5 CO_2 atmosferinde çoğaltılıp muhafaza edildi. RPMI 1640 medyumu %10 FBS ve %1 penisilin streptomisin (100 ünite/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) ile karıştırılarak MCF-7 hücre kültürleri için kullanıldı. DMEM medyumu %10 FBS ve %1 penisilin streptomisin (100 ünite/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) ile karıştırılarak HepG2 ve BeWo hücre kültürleri için kullanıldı.

3.2.2.2. MTT Deneyi

Karpuz suyu liyofilizatının MCF-7, HepG2 ve BeWo hücre hatları üzerindeki etkisi MTT deneyi ile test edildi (Yu ve ark. 2011). MTT boyası canlı hücrelerin sayısını incelemek için kullanılır. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazlar MTT'de bulunan tetrazolyum halkasını keser, suda çözünemeyen mor-lila renkli formazan ürünü oluşur. Meydana gelen formazan ürünü ortamda bulunan canlı hücrelerin sayısıyla orantılıdır (Şekil 3.2.2.1). Organik çözücü ile formazan ürünü çözünüp absorbans ölçüldü. Karpuz suyu liyofilizatının hücre büyümesine olan etkisi, % hücre canlılığı olarak tespit edilip, liyofilizat uygulanmayan hücreler %100 canlı olarak kabul edildi (Denklem 12). Ayrıca, % inhibisyon oranları da hesaplandı (Denklem 13).



Şekil 3.2.2.1. MTT'de bulunan tetrazolyum halkasının mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından kesimi

MCF-7 (5 x 10^3 hücre/ml), HepG2 (15 x 10^3 hücre/ml) ve BeWo (20 x 10^3 hücre/ml) hücre hatlarının her birinden 0.1 ml alınıp 96 kuyucuklu tabakanın farklı kuyucuklarına bırakıldıktan sonra 37 ^oC ve %5 CO_2/ %95 hava ile %100 nemlendirilmiş ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Karpuz suyu liyofilizatı hücre hatlarına özgü besiyerlerinde farklı konsantrasyonlarda (2 x 0.05-20 mg/ml) hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler steril 0.2 µm gözenekli filtre ile süzüldü. Karpuz suyu liyofilizatı çözeltilerinden 0.1'er ml alınıp her bir farklı kuyucuğa dikkatli bir şekilde hücre hatlarına zarar vermeden ve seri halde eklendi. Numuneler aynı koşullarda tekrar 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücre hatlarının kuyucuklarda %80-%90 yayıldıkları gözlendi. PBS ile hazırlanan 2.5 mg/ml'lik MTT çözeltisinden her kuyucuğa 25 µl ilave edilip 4 saat inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada, oda koşullarında 50 µl izopropil alkol ilave edilip 30 dk 50 rpm/dk çalkalayıcıda çalkalandı. UV microplate okuyucu elisa cihazı kullanılarak 570/690 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Hücre kültürü çalışmaları Class 2B biyogüvenlik kabini içinde yapıldı (Denklem 12-13, Tablo 4.2.1.1-2, Şekil 4.2.1.1-2).

$$\% \text{ Canlılık} = [\ \Delta A_1\ (570\text{-}690) / \Delta A_0\ (570\text{-}690)\ ] \text{ x}100 \qquad (12)$$

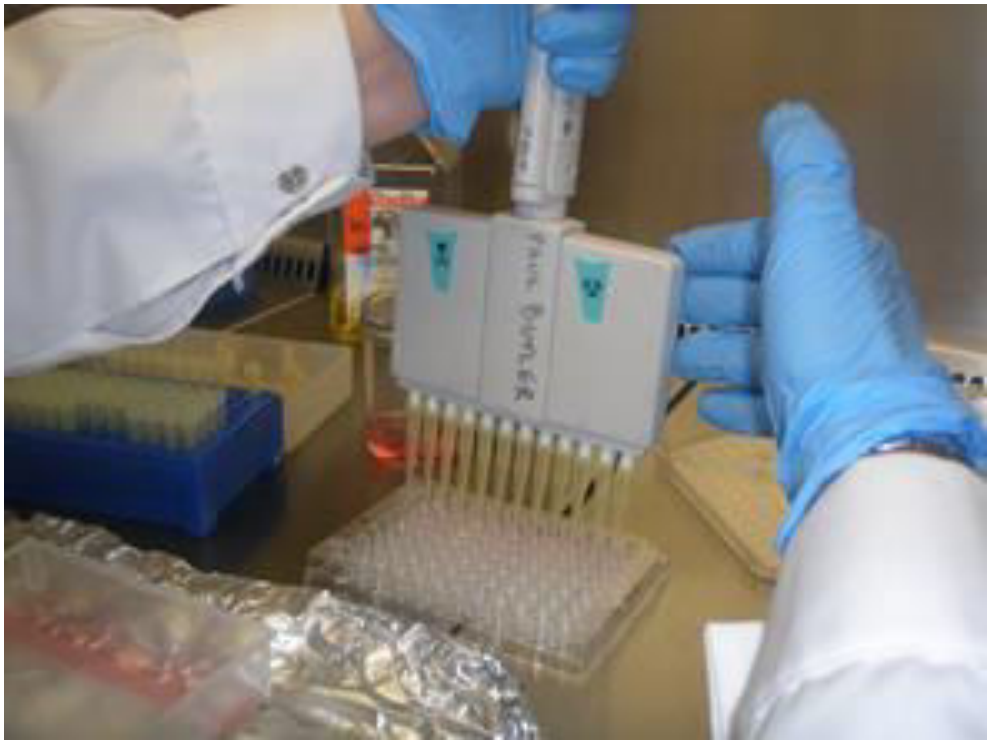
$$\% \text{ İnhibisyon} = [\ (\Delta A_0(570\text{-}690) - \Delta A_1(570\text{-}690)) / \Delta A_0(570\text{-}690)\ ] \text{ x } 100 \qquad (13)$$

A_1 = Karpuz suyu liyofilizatı uygulanmış hücre hatları (numune)

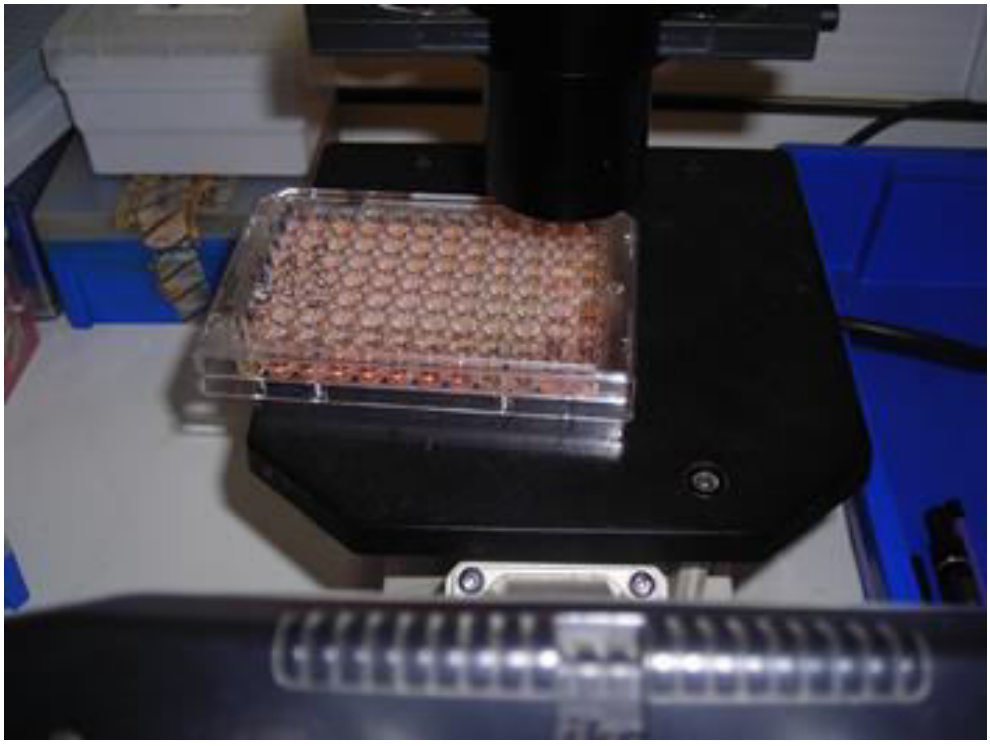
A_0 = Karpuz suyu liyofilizatı uygulanmamış hücre hatları (kontrol)

3.2.3. Toksisite Testi

Karpuz suyu liyofilizatının *V. fisheri* bakterisi üzerine toksik etkisi Mikrotoks testi ile ölçüldü. Pozitif kontrol olarak fenol kullanıldı. Microtox Model 500 Analizör (AZUR Environmental, Carlsbad, CA, USA) cihazı bu test için kullanıldı (Kaiser ve Palabrica 1991). Karpuz suyu liyofilizatının 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik çözeltileri ile fenolün 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik çözeltilerinin 5. ve 15. dk'da *V. fisheri* bakterisi üzerine etkileri tespit edildi (Tablo 4.3.1-2, Şekil 4.3.1-2).



Resim 3.2.2.1. Hücre hattının 96 kuyucuklu tabakaya ekimi



Resim 3.2.2.2. Hücre hattı çoğalmasının mikroskop ile incelenmesi



Resim 3.2.2.3. Hücre hattının büyüme tamponunun değiştirilmesi



Resim 3.2.2.4. MTT uygulanmış hücre hattının çözünürleştirilmesi

3.2.4. *İn Vivo* Metotlar

3.2.4.1. Hayvan Deneyleri

Arsenik, farklı yükseltgenme basamakları arasındaki dönüşümler sırasında ROT meydana getirir ve organ zehirlenmelerine sebep olur. Arseniğe bağlı ROT çoğunlukla NADPH oksidaz aracılı metabolik yollarda meydana gelir. ROT doğrudan hücresel biyomoleküllerle etkileşirler, hücrelerde lipid, protein ve DNA'ya hasar verirler, sonuç olarak hücre ölümüne sebep olabilirler.

Sıçanlarda arsenik toksisitesi oluşturulup, Diyarbakır karpuz suyu ve liyofilizatının oluşan hasara karşı koruma etkisi araştırıldı. Bu çalışmada kullanılan tüm deneysel prosedürler ve protokoller Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK) tarafından "Sodyum arsenit uygulanan ratlarda Diyarbakır Karpuzu'nun koruyucu etkisinin ve antioksidan aktivitesinin araştırılması" adlı proje ile 2012/26 protokol numaralı etik kurul kararı ile onaylandı (Ek 7).

Bu araştırmada, ortalama 265 g ağırlığında 90 adet erkek Wistar albino ırkı sıçan her grupta 10'ar tane olacak şekilde kullanıldı (çalışma sırasında her grup 10 sıçan olacak şekilde takviye yapıldı). Hayvanlar havalandırmalı, 25 ± 2 ^{o}C oda sıcaklığında, düzenli olarak 12 saat gece/gündüz döngüsünde, standart hijyen koşullarında ve pellet yemi ile çeşme suyu verilerek muhafaza edildiler. Sıçanlar aşağıda olduğu gibi 9 gruba rastgele bölündü ve tarif edilen şekilde diyet programı uygulandı (Yadav ve ark. 2010).

1. Grup; standart sıçan yemi ve distile su (1 ml).

2. Grup; standart sıçan yemi ve zeytinyağı ile hazırlanmış NaCl ve şeker (1 ml).

3. Grup; standart sıçan yemi ve karpuz suyu (1 ml).

4. Grup; standart sıçan yemi ve distile su ile hazırlanmış karpuz suyu liyofilizatı (100 mg/kg, 1 ml).

5. Grup; standart sıçan yemi ve ticari likopen (0.007 mg/ml, 1 ml)

6. Grup; standart sıçan yemi ve distile su ile hazırlanmış $NaAsO_2$ (20 mg/kg, 1 ml).

7. Grup; standart sıçan yemi, karpuz suyu ile hazırlanmış $NaAsO_2$ (20 mg/kg, 1 ml).

8. Grup; standart sıçan yemi, distile su ile hazırlanmış $NaAsO_2$ (20 mg/kg, 1 ml) ve karpuz suyu liyofilizatı (100 mg/kg, 1 ml).

9. Grup; standart sıçan yemi ve zeytinyağı ile hazırlanmış ticari likopen (0.007 mg/ml, 1 ml) ve $NaAsO_2$ (20 mg/kg, 1 ml).



Resim 3.2.4.1. Sıçanların gruplandırılması

Karpuz suyu ve liyofilizat içinde bulunan toplam şeker miktarı önceki deneylerimizde hesaplanmıştı. Elde edilen bu veriler ve $NaAsO_2$ içinde bulunan Na miktarları ışığında NaCl+şeker (2. grup) kontrol grubu oluşturuldu. Buradaki amacımız; karpuz suyu veya liyofilizatın $NaAsO_2$ ile uygulanmasında bu iki grupta şeker ve sodyumdan kaynaklanan etkiyi izlemekti. Bunlara ilaveten, deneysel çalışmalarımız kapsamında karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan likopen miktarı da hesaplandı. Bu sonuçlardan yola çıkarak da ticari likopen grubunun dozu ayarlandı. Ayrıca, ticari likopen çözeltisini saf zeytinyağında hazırladığımızdan bunun da etkisini incelemek için 2. grubun diyeti (NaCl+şeker) saf zeytinyağı ile hazırlandı.

Yukarıda belirtilen miktarlarda karpuz suyu ve liyofilizat her gün, $NaAsO_2$ ise ilk iki hafta (14 gün) günaşırı uygulandı. Ancak, arsenikli bazı gruplarda sıçan kaybı yaşanınca $NaAsO_2$ üç günde bir verilmeye başlandı. Bütün uygulamalar mide içi sondası kullanılarak yapıldı. İki hafta sonunda bütün gruplardan dörder sıçan, dördüncü hafta sonunda ise geriye kalan altı sıçan eter anestezisi kullanılarak sakrifiye edildi (Yadav ve ark. 2010).

3.2.4.2. Vücut Ağırlık Takibi

Sıçanlar başlangıçta ve deney boyunca haftada bir olmak üzere toplam beş defa tartıldı. Sıçanlardaki ağırlık değişimlerinin ortalaması alınıp zamana bağlı olarak ağırlıklarındaki değişim kaydedildi (Altaş ve ark. 2011), (Şekil 4.4.1).

3.2.4.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Son diyet uygulamasından 24 saat sonra tüm gruplardaki denekler bir eter tankının içerisine konularak bayıltıldı ve son tartımları alındı. Sakrifikasyon sonunda göğüs kafesi açılarak hiç beklemeden intrakardiyak girişimle kan örneği silikonlu tüplere alındı. Daha sonra karaciğer, böbrek ve beyin dokuları çıkartıldı, deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere dondurucuda (-20 ^{o}C) saklandı (Sahreen ve ark. 2011).

3.2.4.4. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Sıçanlardan alınan tüm doku örnekleri homojenize edilmeden önce tartıldı ve falkon tüplerine etiketlenerek konuldu. 1 mM EDTA içeren 100 mM KH_2PO_4 tamponu pH 7.4 olacak şekilde hazırlandı. Sıçan dokularının 1 mM EDTA içeren 100 mM KH_2PO_4 tamponu (pH = 7.4) ile sonikatörde homojenize edilmesiyle dokuların %10'luk homojenatı elde edildi. Hazırlanan homojenat 12.000 x g'de (4 ^{o}C) 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı toplanıp etiketlenerek deneylerde kullanılmak üzere dondurucuda (-20 ^{o}C) saklandı (Sahreen ve ark. 2011).

3.2.4.5. Biyokimyasal Analizler

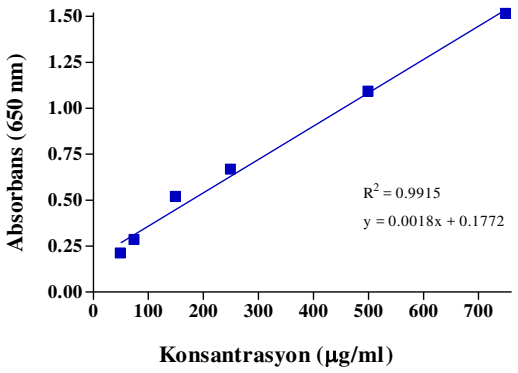
Kan örnekleri silikonlu tüplere alınıp aynı gün santrifüj edildi. Ayrılan serumlarda kan şekeri (glukoz), trigliserid (trig), kolesterol (chol) (Tablo 4.4.2.1), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin ve albumin değerleri biyokimya otoanalizör (Roche ISE900 modular P800) cihazı ile UV fotometrik yöntemle tayin edildi (Altaş ve ark. 2011) (Tablo 4.4.2.2).

3.2.4.6. Protein Miktar Tayini

Sıçan karaciğer dokularındaki protein miktarı Hartree-Lowry Metodu ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951, Hartree 1972). BSA standart protein olarak kullanıldı. Bu metotda proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona girerek folin reaktifi ile indirgenir. Bu sırada oluşan mavi rengin şiddeti ile protein konsantrasyonu arasında bir orantı vardır.

Stok protein standardı olarak BSA kullanıldı. 1 mg/ml BSA stok çözeltisi 1 mM EDTA içeren 100 mM pH 7.4 fosfat tamponu ile hazırlandı.

BSA çözeltilerinden (50-750 µg/ml) 1'er ml ve sıçan karaciğer doku homojanatlarından 2 µl (998 µl PBS ilave edildi) alınıp farklı tüplere konuldu (kör için 1 ml tampon). Bunun üzerine 0.9 ml Reaktif A ilave edildi. Tüpler 10 dk 50 ^{o}C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Sıcak su banyosundan alınan bütün tüpler oda sıcaklığına gelince 1'er ml Reaktif B ilave edildi ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlemden sonra 3'er ml Reaktif C ilave edilip 50 ^{o}C'de su banyosunda tekrar 10 dk inkübasyona bırakıldı. Örnekler oda sıcaklığına gelince 650 nm'de absorbansları ölçüldü ve artan BSA konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.2.4.1). Elde edilen standart eğri denkleminden karaciğer doku homojenatlarının protein miktarları hesaplandı (Denklem 14, Tablo 4.4.5.1-2, Şekil 4.4.3).



Şekil 3.2.4.1. Standart BSA grafiği

Absorbans (A) = 0.0018 x BSA (µg) + 0.1772 (14)

3.2.4.7. Protein Karbonil Miktar Tayini

Sıçan karaciğer dokularındaki oksidatif stres sonucu oluşan protein karbonil miktarı Levine ve ark. (1990)'nın metoduna göre tayin edildi. DNPH substrat olarak kullanıldı. Proteinlerdeki oksidatif hasar; DNPH ile tepkimesi sonucu hidrazonları oluşturan karbonil gruplarının miktarıyla ölçülür. Sıçan karaciğer doku homojenatından 0.1 ml ve 2 M HCl ile hazırlanmış 1 ml 10 mM DNPH çözeltisi deney tüplerinde karıştırıldıktan sonra 37 ^{o}C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra, karışıma 1 ml soğuk %10 TCA (w/v) çözeltisi eklendi. TCA çözeltisi proteinlerin çökmesini

sağlamaktadır. İyice karıştırılan bu karışım 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldükten sonra deney tüpünün dibindeki protein pelleti 2 ml etanol:etil asetat (1:1, v/v) karışımı ile 3 defa yıkandı. Bu pellet daha sonra 1 ml 6 M guanidine-HCl ile süspansiyon haline getirilip 37 ^{o}C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Son olarak, ortamdaki kalıntıları çöktürmek için 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Karbonil miktarı spektrofotometrik olarak süpernatantın 370 nm'de ölçülmesi ile tayin edildi. Sonuçlar aşağıdaki eşitliklerden nmol/ml ve nmol/mg protein olarak hesaplandı (Denklem 15-16, Tablo 4.4.5.1-2, Şekil 4.4.4).

a) A = ε. c. I = log (l_o/I) Lambert-Beer denkleminden yola çıkılarak aşağıdaki eşitlikten nmol/ml olarak bulundu. 370 nm dalga boyunda ε değeri 22.000 M^{-1}.

A = Absorbans

ε = Ekstinksiyon katsayısı veya absorpsiyon katsayısı (Extinction cefficient)

c = konsantrasyon (mol/litre)

I = ışığın katettiği yol (cm)

l_o = gelen ışık

Protein karbonili (nmol/ml) = A_{370nm} x (M / 22.000) x 1 cm küvet (15)

= A_{370nm} x 45.45 x 10^{-6} M

= A_{370nm} x 45.45 nmol/ml

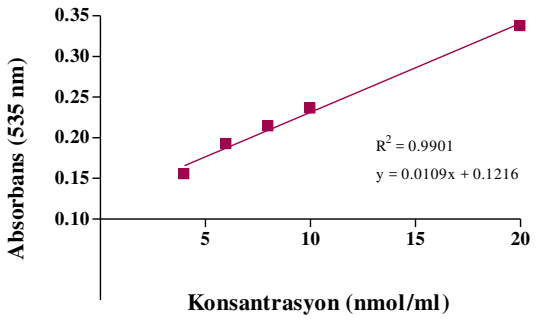
b) Protein miktarından da yola çıkılarak aşağıdaki eşitlikten protein karbonil miktarı nmol/mg cinsinden bulundu.

Protein karbonil (nmol/mg) = [P. karbonil (nmol/ml) / P. miktarı (mg/ml)] (16)

3.2.4.8. Lipid Peroksidasyonu

Sıçan karaciğer dokusunda oluşan lipid peroksidasyonu; aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile TBA'nın reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanılarak ölçüldü (Sahreen ve ark. 2011). Standart olarak TMP kullanıldı. TMP'nin 10 µmol/ml'lik stok çözeltisi 0.05 M H_2SO_4 çözeltisi ile hazırlandı. Bu stoktan da 4-20 nmol/ml'lik seri çözeltiler 0.05 M H_2SO_4 ile hazırlandı. Hazırlanan seyreltik TMP'lerden 500'er µl ve doku homojenatlarından 500'er µl alınıp farklı deney tüplerine konuldu. Her bir deney tüpüne

sırasıyla; H_2O ile hazırlanmış 1.8 ml %20 TCA ve toplam hacim 4 ml olacak şekilde 0.05 M H_2SO_4 ilave edildi. Daha sonra, bütün tüplere H_2O ile hazırlanmış 1 ml %0.67'lik TBA ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı, 95 ^oC'de su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolan tüpler buzlukta (-20 ^oC) soğutulup her birine 5 ml n-bütanol ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı (kapaklı deney tüpleri kullanıldı). Numuneler soğutmalı santrifüj cihazı ile +4 ^oC ve 3000 rpm'de 10 dk santirifüjlendi. Organik fazın 535 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve artan konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.2.4.2). Hazırlanan TMP standart grafiği kullanılarak nmol MDA/TMP eşdeğeri cinsinden 1 ml doku homojenatındaki MDA miktarı hesaplandı (Denklem 17, Tablo 4.4.5.1-2, Şekil 4.4.5).



Şekil 3.2.4.2. Standart TMP grafiği

Absorbans (A) = 0.0109 x TMP (nmol) + 0.1216 (17)

3.2.4.9. Katalaz Aktivitesi Tayini

Sıçan karaciğer homojenatının katalaz (CAT) aktivitesi spektrofotometrik metot ile tayin edildi (Chance ve Maehly 1955). Tepkime ortamı için spektrofotometre küveti kullanıldı. Sırasıyla, 50 mM pH 5.0 posfat tamponu (PBS) ile cihaza sıfır ayarı yapıldı, bir küvete 1450 µl fosfat tamponu eklenip sıfır ayarı tekrar yapılıp PBS ile taze hazırlanmış 50 µl 750 mM H_2O_2 küvete hızlıca eklendi ve anında (sıfırıncı dk) absorbans ölçüldü. İkinci bir küvete 1450 µl PBS ve 1 µl doku örneği (enzim) eklendi iyice karıştırıldı (pipetaj ile). Bu karışımın absorbansı ölçüldükten sonra bununla cihaza sıfır ayarı yapılıp hızlı bir şekilde H_2O_2 (substrat) eklendi ve değişen zamanlarda (0. dk ve 1. dk) absorbansı ölçüldü. Birer dk bekledikten sonra 240 nm'deki absorbans değişimi tespit edildi. Katalaz enzimi, H_2O_2'in yıkımını katalize eder. H_2O_2'in katalaz

tarafından yıkım hızı H_2O_2'in 240 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzim aktivitesi H_2O_2'in 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (39.4 mM/ cm) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar bir dk sonra hem katalaz aktivitesi (U/ml) hem de spesifik katalaz aktivitesi (U/mg) olarak aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı (Denklem 18-19), Tablo 4.4.6.1-2).

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/ml)} = [(\Delta A \times V_t) / (39.4 \text{ mM / cm} \times V_ö)] \quad (18)$$

$$\text{Katalaz spesifik aktivitesi (U/mg protein)} = \text{Katalaz aktivitesi / P.miktarı} \quad (19)$$

ΔA = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam hacim

$V_ö$ = Örnek hacmi

3.2.5. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS for 12.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için paremetrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. Buna göre $p \leq 0.05$ iken sonuçlar anlamlıdır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *İn Vitro* Metotlar

4.1.1. Toplam Fenolik Bileşen, Flavonoid Bileşen ve Likopen Miktar Tayini

Karpuz suyu ve liyofilizatın toplam fenolik, flavonoid ve likopen içeriği tayin edildi (Denklem 1-3).

Tablo 4.1.1. Karpuz suyu ve liyofilizatın toplam fenolik, toplam flavonoid ve likopen analizi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	Total fenolik (µg GAE)	Total flavonoid (µg QUE)	Likopen (mg/kg)
Karpuz suyu (ml)	2490.00 ± 2.14^{a}	9.84 ± 1.50^{x}	88.61 ± 0.17
Liyofilizat (mg)	69.93 ± 13.53^{b}	0.23 ± 0.34^{y}	88.28 ± 3.92

4.1.2. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

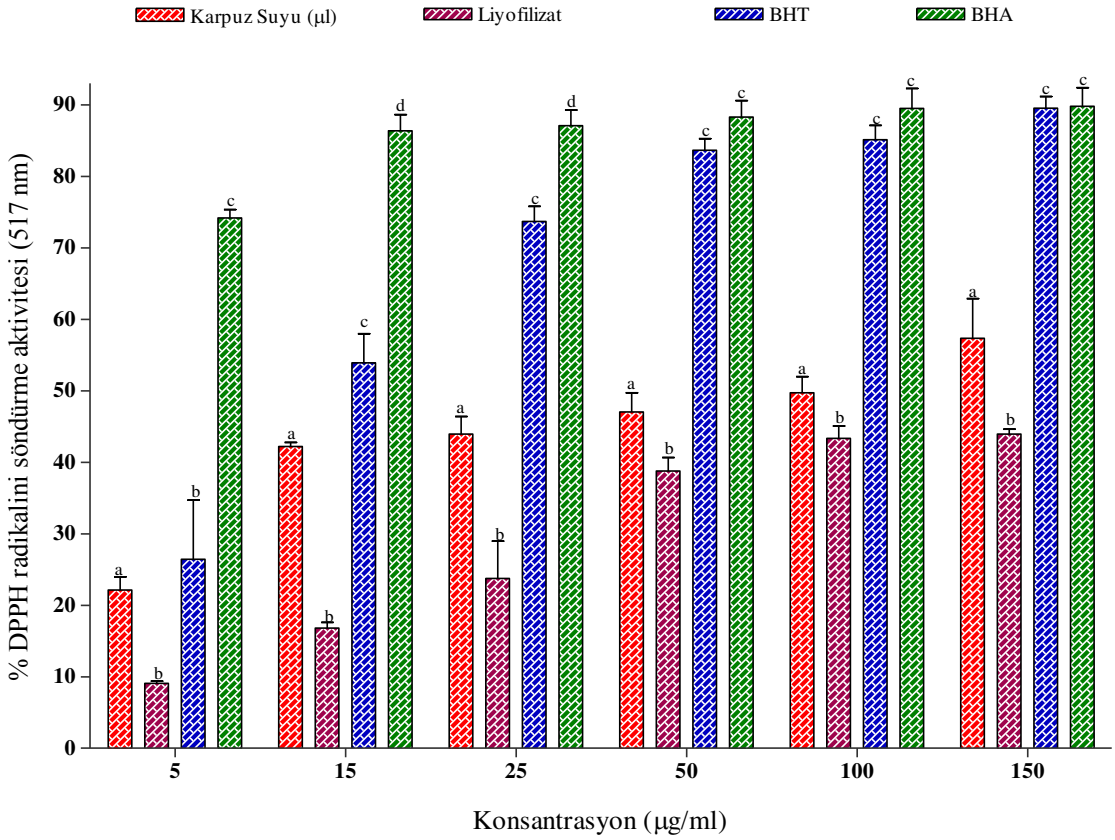
Karpuz suyu ve liyofilizatın serbest radikal söndürme aktivitesi Blois (1958) metodu ile tayin edildi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Liyofilizat ve pozitif kontrollerin 1 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki karpuz suyu (5-15-25-50-100-150 µl/ml), liyofilizat ile pozitif kontrol (5-15-25-50-100-150 µg/ml) numunelerinin absorbansı 517 nm dalga boyunda ölçüldü.

Denklem 4 kullanılarak elde edilen sonuçlardan % DPPH radikalini söndürme aktivitesi hesaplandı. Artan konsantrasyona karşı % DPPH radikalini söndürme aktivitesi değerleri grafiğe geçirildi.

Çalışılan konsantrasyon aralığında pozitif kontroller BHA 74.187 ± 1.18 – 89.818 ± 2.61 ve BHT 26.448 ± 8.27 – 89.547 ± 1.63 arasında % inhibisyon gösterdi. Karpuz suyu 9.075 ± 0.32 – 43.965 ± 0.68 ve liyofilizat 22.140 ± 1.86 – 57.333 ± 5.56 arasında % inhibisyon gösterdi. Karpuz suyu ve liyofilizat ile pozitif kontrollerin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi verileri Tablo 4.1.2 ve Şekil 4.1.2'de verilmektedir.

Tablo 4.1.2. Karpuz suyu (5-15-25-50-100-150 µl/ml), liyofilizat ve pozitif kontrol (5-15-25-50-100-150 µg/ml) çözeltilerinin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	% DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi			
Konsantrasyon (µg/ml)	**Karpuz Suyu** (µl/ml)	**Liyofilizat**	**BHT**	**BHA**
5	9.075 ± 0.32^{a}	22.140 ± 1.86^{b}	26.448 ± 8.27^{b}	74.187 ± 1.18^{c}
15	16.799 ± 0.81^{a}	42.200 ± 0.60^{b}	53.914 ± 4.08^{c}	86.387 ± 2.25^{d}
25	23.766 ± 5.18^{a}	43.970 ± 2.44^{b}	73.706 ± 2.09^{c}	87.081 ± 2.19^{d}
50	38.772 ± 1.90^{a}	47.033 ± 2.71^{b}	83.646 ± 1.63^{c}	88.284 ± 2.32^{c}
100	43.349 ± 1.74^{a}	49.733 ± 2.27^{b}	85.121 ± 2.02^{c}	89.505 ± 2.81^{c}
150	43.965 ± 0.68^{a}	57.333 ± 5.56^{b}	89.547 ± 1.63^{c}	89.818 ± 2.61^{c}



Şekil 4.1.2. Karpuz suyu (5-15-25-50-100-150 µl/ml), liyofilizat ve pozitif kontrol (5-15-25-50-100-150 µg/ml) çözeltilerinin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.1.3. ABTS Radikal Katyonu Kullanarak Serbest Radikal Süpürme Etkisi

Karpuz Suyu ve liyofilizatın serbest radikal süpürme etkisi ABTS radikal katyonun renksizleştirilmesi deneyi ile belirlendi (Kumar ve Chattopadhyay 2007). Trolox, askorbik asit, quercetin ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki taze karpuz suyu (5, 15, 25, 50, 100 µl/ml) ve liyofilizat ile pozitif kontrollerin (5, 15, 25, 50, 100 µg/ml) ABTS aktivitesi 734 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi.

Numunelerin % inhibisyon değerleri Denklem 5 kullanılarak hesaplandı. Artan konsantrasyona karşı % ABTS radikalini süpürme etkisi değerleri grafiğe geçirildi.

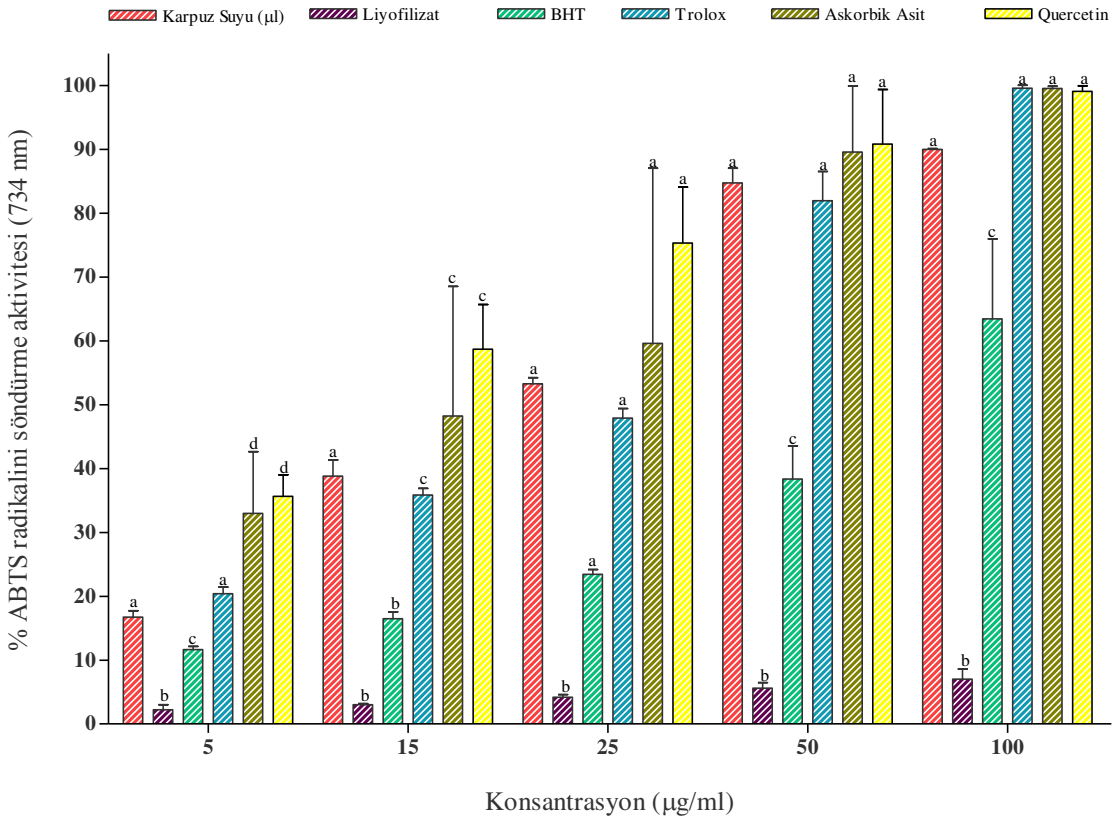
Çalışılan konsantrasyon aralığında pozitif kontroller BHT 11.670 ± 0.49– 63.467 ± 12.56, trolox 20.407 ± 1.06 - 99.607 ± 0.44, quercetin 35.660 ± 3.39 - 99.084 ± 0.87 ve askorbik asit 32.976 ± 9.68 – 99.560 ± 0.32 arasında % inhibisyon gösterdi. Karpuz suyu 16.751 ± 0.99 – 90.008 ± 0.12 ve liyofilizat 2.216 ± 0.79 – 7.013 ± 1.58 arasında % inhibisyon gösterdi. % ABTS radikalini söndürme aktivitesi verileri Tablo 4.1.3 ve Şekil 4.1.3' de verilmektedir.

Tablo 4.1.3. Karpuz suyu (5-15-25-50-100 µl/ml), liyofilizat, BHT ve trolox (5-15-25-50-100 µg/ml) çözeltilerinin % ABTS radikalini söndürme aktivitesi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	% ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi			
Konsantrasyon (µg/ml)	**Karpuz Suyu** (µl/ml)	**Liyofilizat**	**BHT**	**Trolox**
5	16.751 ± 0.99^{a}	2.216 ± 0.79^{b}	11.670 ± 0.49^{c}	20.407 ± 1.06^{a}
15	38.811 ± 2.56^{a}	3.041 ± 0.14^{b}	16.498 ± 1.08^{b}	35.851 ± 1.05^{c}
25	53.305 ± 0.93^{a}	4.198 ± 0.39^{b}	23.456 ± 0.75^{a}	47.933 ± 1.48^{a}
50	84.748 ± 2.30^{a}	5.615 ± 0.85^{b}	38.349 ± 5.19^{c}	81.963 ± 4.59^{a}
100	90.008 ± 0.12^{a}	7.013 ± 1.58^{b}	63.467 ± 12.56^{c}	99.607 ± 0.44^{a}

Tablo 4.1.3. (Devamı). Karpuz suyu (5-15-25-50-100 µl/ml), liyofilizat, quercetin ve askorbik asit (5-15-25-50-100 µg/ml) çözeltilerinin % ABTS radikalini söndürme aktivitesi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	% ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi			
Konsantrasyon (µg/ml)	**Karpuz Suyu** (µl/ml)	**Liyofilizat**	**Quercetin**	**Askorbik Asit**
5	16.751 ± 0.99^{a}	2.216 ± 0.79^{b}	35.660 ± 3.39^{d}	32.976 ± 9.68^{d}
15	38.811 ± 2.56^{a}	3.041 ± 0.14^{b}	58.700 ± 7.02^{c}	48.262 ± 20.28^{c}
25	53.305 ± 0.93^{a}	4.198 ± 0.39^{b}	75.325 ± 8.78^{a}	59.638 ± 27.43^{a}
50	84.748 ± 2.30^{a}	5.615 ± 0.85^{b}	90.833 ± 8.58^{a}	89,617 ± 10,31^{a}
100	90.008 ± 0.12^{a}	7.013 ± 1.58^{b}	99.084 ± 0.87^{a}	99.560 ± 0.32^{a}



Şekil 4.1.3. Karpuz suyu (5-15-25-50-100 µl/ml), liyofilizat ve pozitif kontrol (5-15-25-50-100 µg/ml) çözeltilerinin % ABTS radikalini söndürme aktivitesi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.1.4. İndirgeme Gücü

Diyarbakır karpuz suyu liyofilizatı varlığında Fe^{3+}/Fe^{2+}'ye dönüşümü Oyaizu (1986) metodu ile incelendi. BHA, BHT ve α-tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki liyofilizat ile pozitif kontrollerin (50, 100, 250 µg/ml) indirgeme gücü 700 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek belirlendi. Bulunan absorbans değerleri artan konsantrasyona karşı grafiği geçirildi.

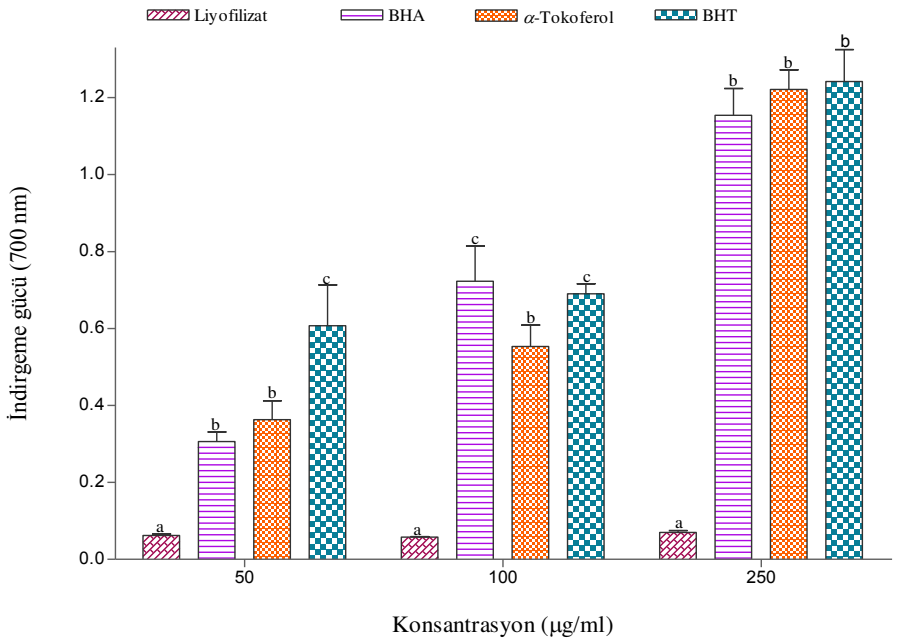
Bu testte yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir.

Çalışılan konsantrasyon aralığında pozitif kontroller BHT 0.607 ± 0.11 – 1.242 ± 0.08, BHA 0.306 ± 0.03 - 1.154 ± 0.07 ve α-tokoferol 0.363 ± 0.05 - 1.221 ± 0.05 arasında indirgeme gücü etkisi gösterdi. Liyofilizat ise 0.062 ± 0.00 – 0.070 ± 0.01

arasında indirgeme gücü gösterdi. Liyofilizat ve pozitif kontrollerin indirgeme gücü verileri Tablo 4.1.4 ve Şekil 4.1.4 de verilmektedir.

Tablo 4.1.4. Liyofilizat ve pozitif kontrollerin (BHA, BHT, *α*-Tokoferol) farklı konsantrasyonlarda (50,100 ve 250 µg/ml) Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analizi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Konsantrasyon (µg/ml)	İndirgeme Gücü			
	Liyofilizat	**BHA**	***α*-Tokoferol**	**BHT**
50	0.062 ± 0.00^{a}	0.306 ± 0.03^{b}	0.363 ± 0.05^{b}	0.607 ± 0.11^{c}
100	0.058 ± 0.00^{a}	0.723 ± 0.09^{c}	0.553 ± 0.06^{b}	0.690 ± 0.03^{c}
250	0.070 ± 0.01^{a}	1.154 ± 0.07^{b}	1.221 ± 0.05^{b}	1.242 ± 0.08^{b}



Şekil 4.1.4. Liyofilizat ve pozitif kontrollerin (BHA, BHT, *α*-Tokoferol) farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 µg/ml) Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analizi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.1.5. Metal Şelatlama Aktivitesi

Karpuz suyu ve liyofilizatın metal şelatlama aktivitesi Dinis ve ark. (1994)'nın metodu ile ölçüldü. EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. UV-VIS spektrofotometre cihazında 562 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Denklem 6 kullanılarak 562 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerinden Fe^{2+}-ferrozine kompleksinin inhibisyon yüzdesi verileri hesaplandı.

Karpuz suyunun 1 ml'sinin % metal şelatlama aktivitesi 8.629 ± 0.509 ve 1 mg/ml liyofilizatın 12.891 ± 2.71 olarak hesaplandı, Tablo 4.1.5'de verilmektedir.

Tablo 4.1.5. Karpuz suyu (1 ml/ml), liyofilizat ve EDTA (0.1 mg/ml ve 1 mg/ml) çözeltilerinin % metal şelatlama aktivitesi spektrofotometrik analizi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir $p \leq 0.05$

	% Metal Şelatlama Aktivitesi		
Konsantrasyon	**Liyofilizat**	**EDTA**	**Karpuz Suyu**
1 ml	-	-	8.629 ± 0.509
1 mg/ml	12.891 ± 2.71	99.408 ± 0.57	-

4.1.6. Hidroksil Radikalini Söndürme Aktivitesi

Karpuz suyunun hidroksil radikalini söndürme aktivitesi deoksiriboz metodu ile Fe^{2+}/ askorbat/ EDTA/ H_2O_2 sisteminde göre incelendi (Kumar ve Chattopadhyay 2007). 532 nm'de ölçülen değerlerin % inhibisyon sonuçları Denklem 7'ye göre hesaplandı.

Karpuz suyunun 1 ml'nin % hidroksil radikalini söndürme aktivitesi 59.336 ± 3.07 olarak bulundu.

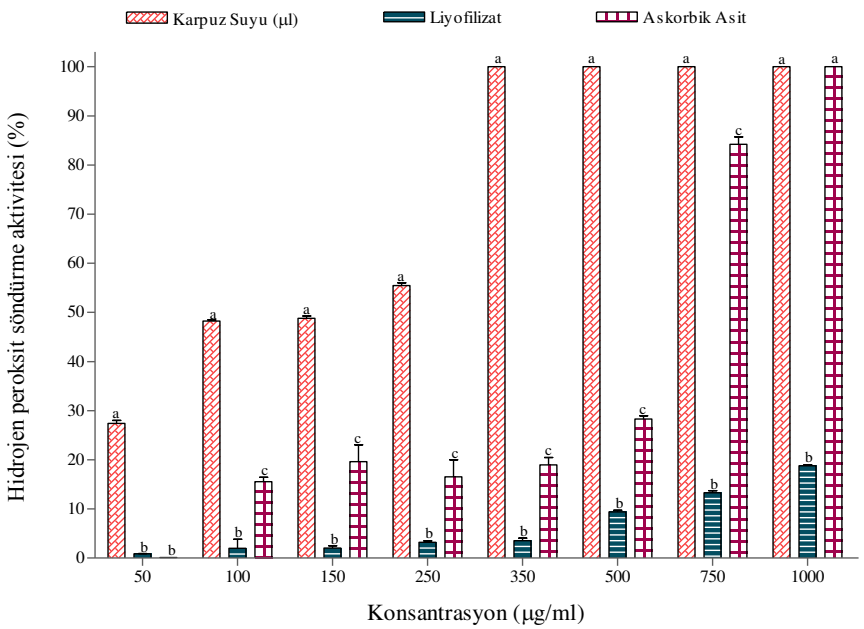
4.1.7. Hidrojen Peroksit Süpürme Etkisi

Karpuz suyu ve liyofilizatın hidrojen peroksit süpürme etkisi titrasyon ile Zhao ve ark. (2006)'nın metoduna göre ölçüldü. Askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki karpuz suyu (50-1000 µl/ml) ile liyofilizat ve askorbik asidin (50-1000 µg/ml) % hidrojen peroksit süpürme etkisi Denklem 8'de belirtildiği gibi hesaplandı.

Çalışılan konsantrasyon aralığında karpuz suyu 27.418 ± 0.61 – 100.000 ± 0.00, liyofilizat 0.854 ± 0.06 - 18.789 ± 0.19 ve askorbik asit 0.106 ± 0.00 – 100.000 ± 0.00 arasında etki gösterdi (Tablo 4.1.7 ve Şekil 4.1.7).

Tablo 4.1.7. Karpuz suyu (50-1000 µl/ml) ile liyofilizat (50-1000 µg/ml) ve askorbik asidin (50-1000 µg/ml) % hidrojen peroksit süpürme aktivitesi titrimetrik analizi. Değerler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	% Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesi		
Konsantrasyon (µg/ml)	**Karpuz Suyu** (µl/ml)	**Liyofilizat**	**Askorbik Asit**
50	27.418 ± 0.61[a]	0.854 ± 0.06[b]	0.106 ± 0.00[b]
100	48.248 ± 0.21[a]	1.990 ± 1.83[b]	15.529 ± 0.92[c]
150	48.797 ± 0.47[a]	2.020 ± 0.48[b]	19.610 ± 3.45[c]
250	55.454 ± 0.58[a]	3.231 ± 0.27[b]	16.550 ± 3.45[c]
350	100.000 ± 0.00[a]	3.544 ± 0.50[b]	18.975 ± 1.48[c]
500	100.000 ± 0.00[a]	9.410 ± 0.33[b]	28.317 ± 0.66[c]
750	100.000 ± 0.00[a]	13.279 ± 0.44[b]	84.211 ± 1.49[c]
1000	100.000 ± 0.00[a]	18.789 ± 0.19[b]	100.000 ± 0.00[a]



Şekil 4.1.7. Karpuz suyu (50-1000 µl/ml) ile liyofilizat (50-1000 µg/ml) ve askorbik asidin (50-1000 µg/ml) % hidrojen peroksit süpürme aktivitesi titrimetrik analizi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.1.8. Vitamin ve Şeker Tayini

Karpuz suyu ve liyofilizatın A, D ve E vitaminleri ile fruktoz, glukoz ve sukroz analizleri Kienen ve ark. (2008)'nın HPLC yöntemi ile gerçekleştirildi. Uygulanan metodun ölçüm aralığı ve çalışılan konsantrasyonlarda karpuz suyunda vitamin D ve E, liyofilizatın içeriğinde ise sukroz tespit edilmedi (T.E). Karpuz suyunda tespit edilen vitamin A, fruktoz, glukoz ve sukroz değerleri sırasıyla şöyledir; 0.23, 18784, 235 ve 229 µg/ml. Liyofilizatta tespit edilen A, D ve E vitamini ile fruktoz ve glukoz değerleri sırasıyla şöyledir; 0.56 µg/g, 3.60 µg/g, 3.77 mg/g 1268.2 mg/g ve 1042.5 mg/g (Tablo 4.1.8).

Tablo 4.1.8. Karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan vitamin ve şeker miktarları

	Vitamin					
	A	D	E	Fruktoz	Glukoz	Sukroz
Karpuz Suyu	0.23[a]	T.E	T.E	18784[a]	235[a]	229[a]
Liyofilizat	0.56[b]	3.60[b]	3.77[c]	1268.2[c]	1042.5[c]	T.E

[a]: µg/ml [b]: µg/g [c]: mg/g

4.1.9. C Vitamini Tayini

Karpuz suyu ve liyofilizatın C vitamini içeriği Tillman reaktifine karşı titrasyonla tayin edildi (Contreras-Calderon ve ark. 2011). Standart madde olarak askorbik asit, pozitif kontrol olarak taze limon suyu kullanıldı. Bulunan sonuçlar şöyledir; karpuz suyu 0.323 ± 0.05 mg AscAE/ml, limon suyu 0.469 ± 0.10 mg AscAE/ml ve liyofilizat 4.697 ± 2.03 mg AscAE/g (Tablo 4.1.9).

Tablo 4.1.9. Karpuz suyu, liyofilizat ve limon suyunun titrimetrik yöntemle C vitamini tayini. Değerler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Verilerde belirtilmiş farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	C Vitamini
	mg AscAE ± SD
Limon Suyu (ml)	0.469 ± 0.10[a]
Karpuz Suyu (ml)	0.323 ± 0.05[a]
Liyofilizat (g)	4.697 ± 2.03[b]

4.1.10. Element Analizi

ICP-OES Cihazı ile Element Analizi

Karpuz suyu ve liyofilizatın Ca, Se, Fe, Cu, Zn, Mn ve Pb analizleri ICP-OES cihazı ile yapıldı. Sonuçlar Tablo 4.1.10.1'de verilmektedir.

Tablo 4.1.10.1. Karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan bazı element miktarlarının ICP-OES cihazı ile elde edilen verileri

	Ca(µg)	**Se**(µg)	**Fe**(µg)	**Cu**(µg)	**Zn**(µg)	**Mn**(µg)	**Pb**(µg)
Karpuz Suyu (ml)	2.98	0.10	0.95	0.04	0.17	0.011	0.011
Liyofilizat (g)	17.01	0.31	1.18	0.18	1.09	0.031	<LOD§

§: Saptama sınırının altında

ICP-MS Cihazı ile Element Analizi

Bu çalışmada, mikrodalga çözünürleştirme sistemi kullanılarak numuneler element analizi için hazırlanıp içerdikleri Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Al, As, Se, Pb, Cr, Cd, Ni, Sr, Ba, V ve U miktarları ICP-MS ile ölçüldü. Standard madde olarak Tomato Leaves (Standard Reference Material 1573a) kullanıldı ve sonuçlar Tablo 4.1.10.2-4'de verilmektedir.

Tablo 4.1.10.2. Liyofilizatta bulunan element (Na, K, Ca, Mg) miktarları. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir ($p \leq 0.05$)

	Na(µg)	**K**(µg)	**Ca**(µg)	**Mg**(µg)
S. R. M. (g)	95.40 ± 4.25	25774.61 ± 789.80	49882.75 ± 1584.43	9512.49 ± 285.2
Liyofilizat (g)	145.29 ± 18.0	23683 ± 1050.09	355.49 ± 35.50	453.62 ± 18.0

Tablo 4.1.10.3. Liyofilizatta bulunan element (Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Se) miktarları. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir ($p \leq 0.05$)

	Fe(µg)	**Mn**(µg)	**Zn**(µg)	**Co**(µg)	**Cu**(µg)	**Se**(µg)
S. R. M. (g)	319.94 ± 21.61	0.23 ± 2.91	21.31 ± 0.01	0.46 ± 0.02	3.84 ± 0.06	0.09 ± 0.00
Liyofilizat (g)	10.71 ± 0.26	0.66 ± 0.01	3.70 ± 0.03	0.06 ± 0.00	2.48 ± 0.07	0.06 ± 0.00

Tablo 4.1.10.4. Liyofilizatta bulunan element (Al, As, Pb, Cr, Cd) miktarları. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir ($p \leq 0.05$)

	Al(µg)	**As**(µg)	**Pb**(µg)	**Cr**(µg)	**Cd**(µg)
S. R. M. (g)	293.68 ± 57.50	0.12 ± 0.00	0.49 ± 0.00	1.38 ± 0.15	1.16 ± 0.04
Liyofilizat (g)	0.59 ± 0.07	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.00 ± 0.00

Tablo 4.1.10.4. (Devamı). Liyofilizatta bulunan element (Ni, Sr, Ba, V, U) miktarları. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir ($p \leq 0.05$)

	Ni(µg)	**Sr**(µg)	**Ba**(µg)	**V**(µg)	**U**(µg)
S. R. M. (g)	1.80 ± 0.06	94.68 ± 0.79	61.62 ± 0.77	0.49 ± 0.05	0.01 ± 0.00
Liyofilizat (g)	2.51 ± 0.05	4.86 ± 0.05	0.16 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00

S.R.M.: Standart referans madde, tomato leaves (Standard Reference Material 1573a)

4.1.11. Protein Miktar Tayini

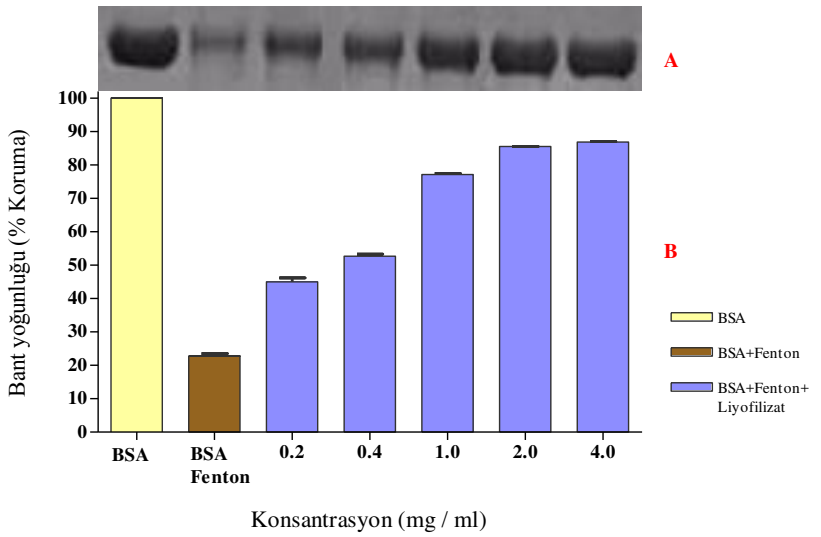
Liyofilizatta bulunan protein miktarı Standart Bradford Metodu ile 50-1500 µg/ml aralığında, Mikro Bradford Metodu ile 1-15 µg/ml aralığında Bradford (1976) yöntemi ile tayin edildi. HSA standart olarak kullanıldı. 595 nm'de absorbans ölçülüp HSA'nın artan konsantrasyonuna karşı absorbans grafikleri çizildi. Denklem 9 ve Denklem 10 kullanılarak bulunan değerler Tablo 4.1.11'de verilmektedir.

Tablo 4.1.11. Liyofilizatta bulunan protein miktarının standart bradford ve mikro bradford metoduna göre HSA ekivalent değerleri. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Verilerde belirtilmiş farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

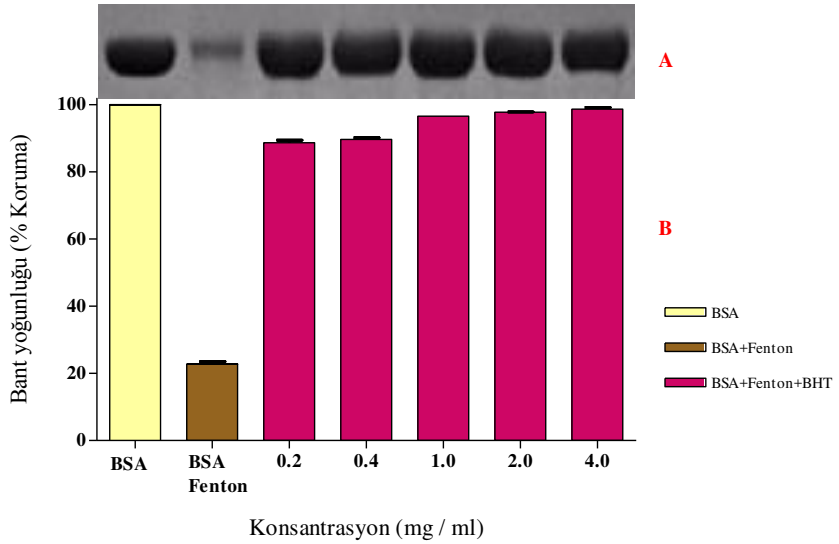
	Standart Bradford	**Mikro Bradford**
	µg HSA ± SD	µg HSA ± SD
Liyofilizat (mg)	13.532 ± 1.118^{a}	10.573 ± 0.387^{b}

4.1.12. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Liyofilizatın artan konsantrasyonlarda BSA'nın oksidatif hasarı üzerine koruyucu etkisi Wang metodu kullanılarak SDS-PAGE elektroforezi ile belirlendi (Laemmli 1970). BSA oksidasyonu Fenton reaksiyonu ile gerçekleştirildi. BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Liyofilizat ve BHT'nin farklı kontsantrasyonlarının (0.2-4.0 mg/ml) BSA (2.0 mg/ml) hasarı üzerine etkileri incelendi. Protein hasarının miktarı ve band yoğunluğu ölçülüp her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grupla standardize edildi. Sonuçlar Şekil 4.1.12.1-2' de verilmektedir.



Şekil 4.1.12.1. (**A**) Fenton reaksiyonu [$FeCl_2$ (1.0 mM), EDTA (1.0 mM) ve H_2O_2 (2.0 mM)] sonucu oluşan hidroksil radikallerinin sığır serum albümininde (BSA, 2.0 mg/ml) meydana getirdiği oksidatif hasara karşı liyofilizatın (0.2-0.4 mg/ml) koruyucu etkisinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelenmesi. (**B**) Her kuyucukta oksidatif hasara karşı korunmuş BSA yüzdeleri. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır

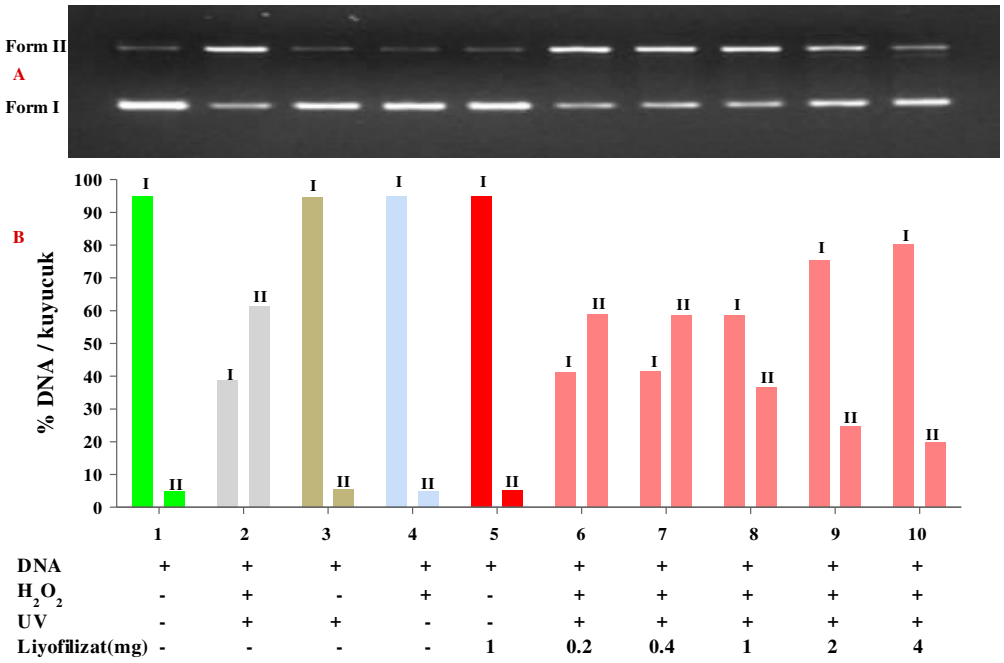


Şekil 4.1.12.2. (**A**) Fenton reaksiyonu [$FeCl_2$ (1.0 mM), EDTA (1.0 mM) ve H_2O_2 (2.0 mM)] sonucu oluşan hidroksil radikallerinin sığır serum albümininde (BSA, 2.0 mg/ml) meydana getirdiği oksidatif hasara karşı bütillenmiş hidroksi toluenin (BHT, 0.2-4.0 mg/ml) koruyucu etkisinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelenmesi. (**B**) Her kuyucukta oksidatif hasara karşı korunmuş BSA yüzdeleri. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır

4.1.13. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Liyofilizatın 0.2-4.0 mg/ml konsantrasyon aralığında DNA'yı OH radikaline karşı koruma etkisi DNA agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Fukuhara ve Miyata 1998).

Liyofilizatın supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisinin % inhibisyon değerleri Denklem 11'e göre hesaplandı (Şekil 4.1.14).



Şekil 4.1.13. (**A**) Liyofilizatın supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisinin agaroz jel elektroforezi. (**B**) Her kuyucuktaki pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Form I, Form II yüzdeleri. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır

4.2. Hücre Canlılığı Çalışmaları

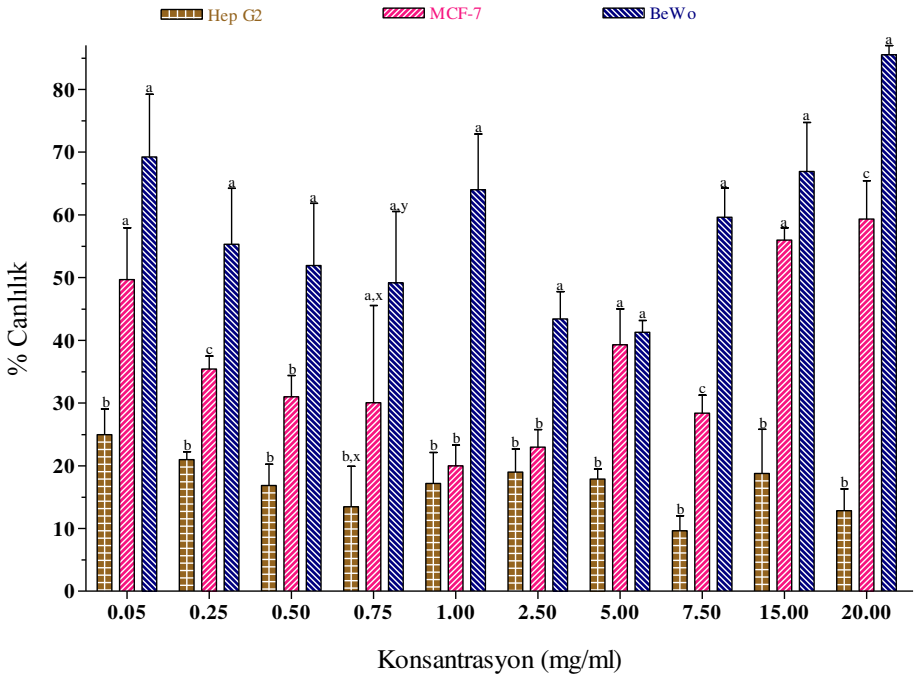
4.2.1. MTT Deneyi

Karpuz suyu liyofilizatının MCF-7, HepG2 ve BeWo hücre hatları üzerindeki etkisi MTT deneyi ile test edildi (Yu ve ark. 2011). UV mikroplaka okuyucu elisa cihazı kullanılarak 570/690 nm dalga boyunda ortamdaki canlı hücre hatlarının absorbansı ölçüldü.

Denklem 12 kullanılarak hücre hatlarının % canlılık oranı ve Denklem 13 kullanılarak % inhibisyon oranı hesaplandı.

Tablo 4.2.1.1. Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	% Canlılık		
Konsantrasyon (mg/ml)	**BeWo** ($20x10^3$ hücre/ml)	**HepG2** ($15x10^3$ hücre/ml)	**MCF-7** ($5x10^3$ hücre/ml)
0.05	69.227 ± 9.97^{a}	24.945 ± 4.09^{b}	49.656 ± 8.28^{a}
0.25	55.315 ± 8.90^{a}	20.985 ± 1.24^{b}	35.423 ± 2.05^{c}
0.50	51.918 ± 9.90^{a}	16.857 ± 3.37^{b}	30.979 ± 3.41^{b}
0.75	$49.152 \pm 11.40^{a,y}$	$13.455 \pm 6.44^{b,x}$	$30.048 \pm 15.50^{a,x}$
1.00	64.013 ± 8.87^{a}	17.170 ± 4.94^{b}	19.976 ± 3.34^{b}
2.50	43.408 ± 4.35^{a}	19.002 ± 3.67^{b}	22.963 ± 2.80^{b}
5.00	41.289 ± 1.85^{a}	17.889 ± 1.57^{b}	39.279 ± 5.70^{a}
7.50	59.610 ± 4.65^{a}	9.614 ± 2.40^{b}	28.387 ± 2.87^{c}
15.00	66.911 ± 7.81^{a}	18.749 ± 7.06^{b}	55.968 ± 1.97^{a}
20.00	85.524 ± 1.44^{a}	12.830 ± 3.46^{b}	59.333 ± 6.12^{c}

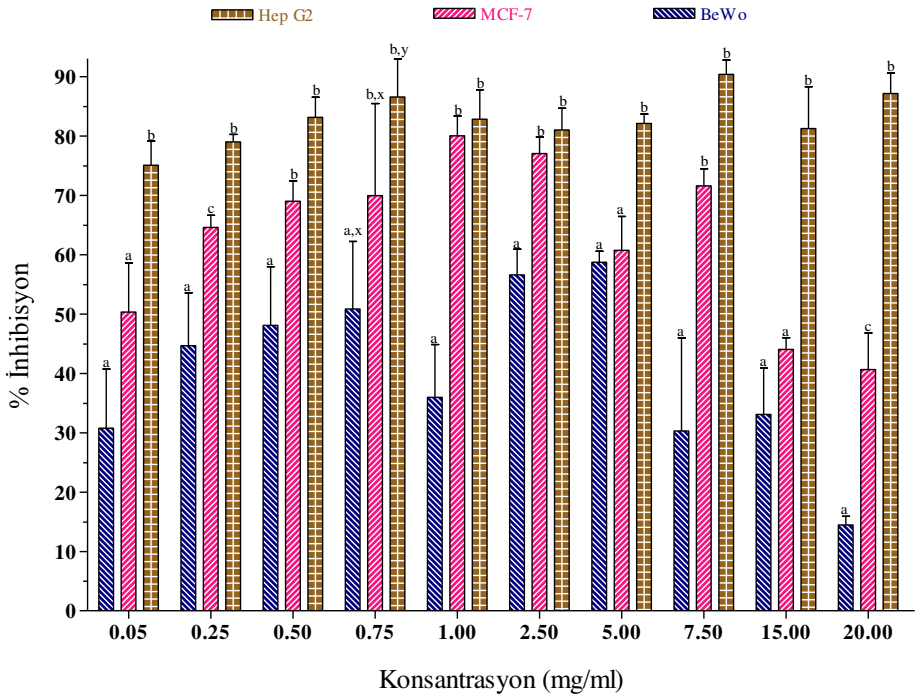


Şekil 4.2.1.1. Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Tablo 4.2.1.2. Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının % inhibisyonu üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

% İnhibisyon

Konsantrasyon (mg/ml)	**BeWo** ($20x10^3$ hücre/ml)	**HepG2** ($15x10^3$ hücre/ml)	**MCF-7** ($5x10^3$ hücre/ml)
0.05	30.773 ± 9.97^{a}	75.055 ± 4.09^{b}	50.344 ± 8.28^{a}
0.25	44.685 ± 8.90^{a}	79.015 ± 1.24^{b}	64.577 ± 2.05^{c}
0.50	48.082 ± 9.90^{a}	83.144 ± 3.37^{b}	69.021 ± 3.41^{b}
0.75	$50.848 \pm 11.40^{a,x}$	$86.545 \pm 6.44^{b,y}$	$69.952 \pm 15.50^{b,x}$
1.00	35.987 ± 8.87^{a}	82.830 ± 4.94^{b}	80.024 ± 3.34^{b}
2.50	56.592 ± 4.35^{a}	80.998 ± 3.67^{b}	77.037 ± 2.80^{b}
5.00	58.711 ± 1.85^{a}	82.111 ± 1.57^{b}	60.721 ± 5.70^{a}
7.50	30.301 ± 15.68^{a}	90.386 ± 2.40^{b}	71.613 ± 2.87^{b}
15.00	33.089 ± 7.81^{a}	81.251 ± 7.06^{b}	44.032 ± 1.97^{a}
20.00	14.476 ± 1.44^{a}	87.170 ± 3.46^{b}	40.667 ± 6.12^{c}



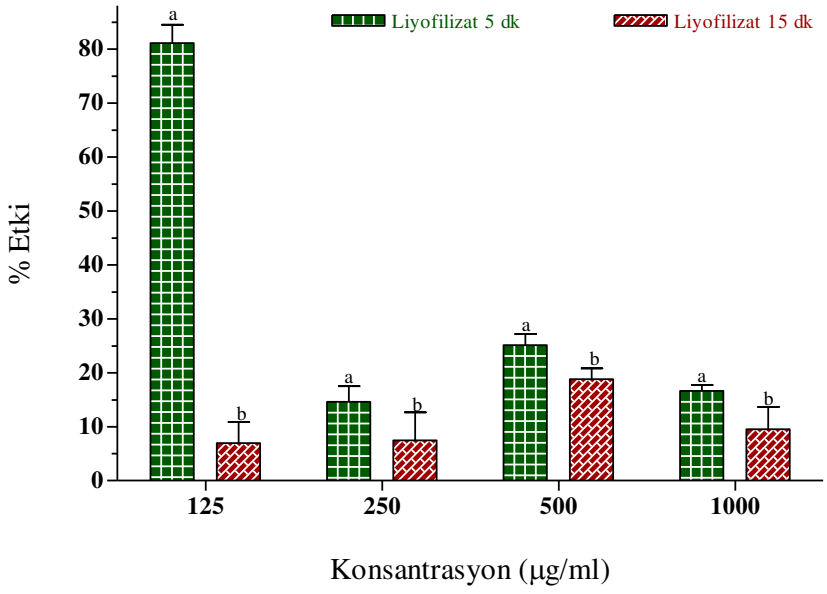
Şekil 4.2.1.2. Karpuz suyu liyofilizatının insan karaciğer karsinoma (HepG2), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan koriyokarsinom (BeWo) hücre hatlarının inhibisyonu üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.3. Toksisite Testi

Karpuz suyu liyofilizatının *V. fisheri* bakterisi üzerine toksik etkisi mikrotoks testi ile ölçüldü. Pozitif kontrol olarak fenol kullanıldı (Kaiser ve Palabrica 1991). Liyofilizatın 125 - 1000 µg/ml'lik çözeltileri ile fenolün 12.5-100 µg/ml'lik çözeltilerinin 5. dk ve 15. dk'da *V. fisheri* bakterisi üzerine etkilerinin verileri Tablo 4.3.1-2 ve Şekil 4.3.1-2'de verilmektedir.

Tablo 4.3.1. Karpuz suyu liyofilizatının farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

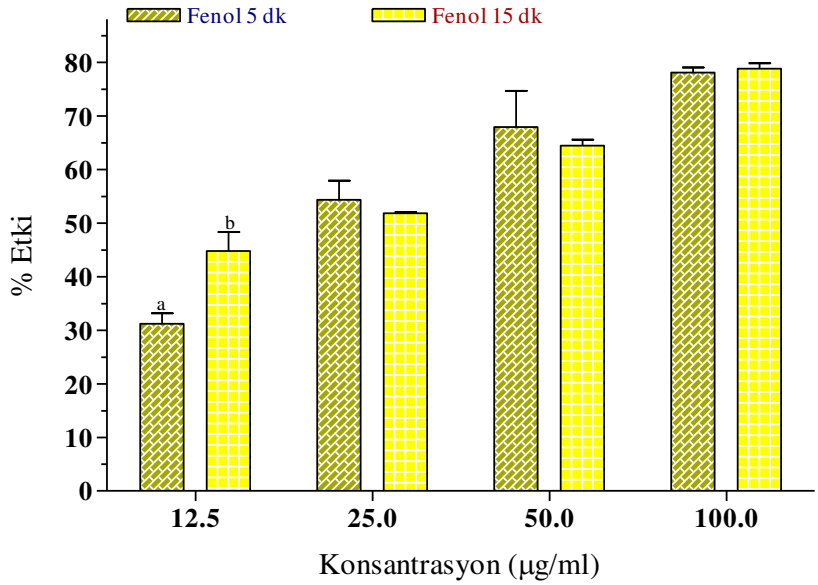
Liyofilizat (µg/ml)	% Etki ± SD	
	5 dk	15 dk
125	81.09 ± 3.40^{a}	6.96 ± 3.90^{b}
250	14.60 ± 2.89^{a}	7.45 ± 5.20^{b}
500	25.09 ± 2.10^{a}	18.81 ± 1.98^{b}
1000	16.63 ± 1.09^{a}	9.55 ± 4.12^{b}



Şekil 4.3.1. Karpuz suyu liyofilizatının farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Tablo 4.3.2. Fenolün farklı konsantrasyonlarda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

	% Etki ± SD	
Fenol (µg/ml)	5 dk	15 dk
12.5	31.21 ± 1.96[a]	44.78 ± 3.50[b]
25	54.34 ± 3.59	51.81 ± 0.21
50	67.93 ± 6.72	64.46 ± 1.12
100	78.10 ± 0.93	78.82 ± 0.98



Şekil 4.3.2. Fenolün farklı konsantrasyonlarda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) 5 dk ve 15 dk sonra *V. fisheri* üzerine etkisi. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı konsantrasyon verilerindeki farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.4. *İn Vivo* Metotlar

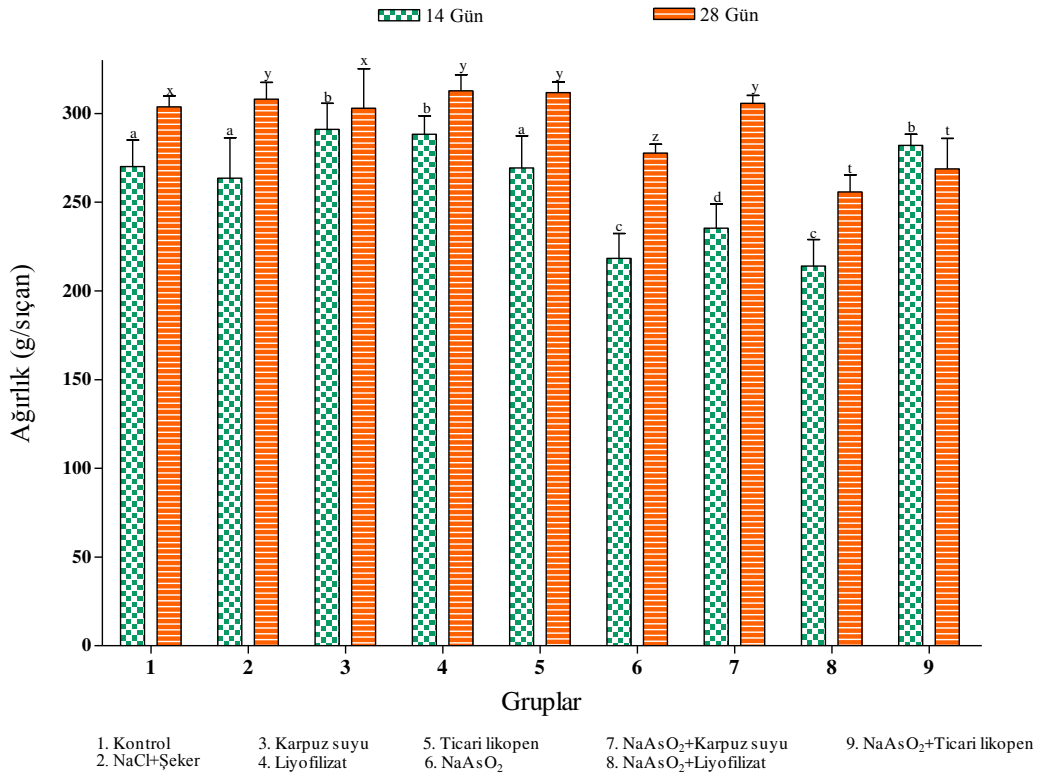
4.4.1. Vücut Ağırlık Takibi

Ratlarda arsenik toksisitesi oluşturulup, Diyarbakır karpuz suyu ve liyofilizatının oluşan hasara karşı koruyucu etkisi araştırıldı.

Bu araştırmada, Wistar albino ırkı erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, 9 gruba rastgele bölündü ve tarif edilen şekilde diyet programı uygulandı (Yadav ve ark. 2010). Deney başlangıcında bütün sıçanların ortalama 265 g ağırlığında olduğu tespit edildi. Sıçanların 14. ve 28. günlerdeki ağırlıklarının ortalama verileri Şekil 4.4.1 de belirtilmektedir (Altaş ve ark. 2011).

Arsenik verilen sıçanların iki hafta sonundaki genel görünümlerinde; halsizlik, gözle görülür kilo kaybı, tüylerde dikleşme ve cansızlık, arka ayaklarda yara oluşumu, gözlerde kızarıklık, burun kanamaları, ağzını açmakta zorluk ve ishal başlangıcı tespit edildi.

İki hafta (14 gün) sonunda, 9. grup (282.00±6.25 g/sıçan) ($NaAsO_2$+ticari likopen) dışında arsenik uygulanan bütün gruplarda (6. Grup ($NaAsO_2$) 218.33±14.05 g/sıçan, 7. Grup ($NaAsO_2$+karpuz suyu) 235.33±13.65 g/sıçan, 8. Grup ($NaAsO_2$+liyofilizat) 214.00±14.93 g/sıçan) kilo kaybı, diğer gruplarda ise kilo artışı kaydedildi. Dört hafta (28 gün) sonunda 8. grup (255.75±9.54 g/sıçan) ($NaAsO_2$+liyofilizat) ve 9. grupta (268.75±17.23 g/sıçan) ($NaAsO_2$+ticari likopen) kilo kaybı, diğer bütün gruplarda kilo artışı tespit edildi. Ayrıca, deney sonunda 1. grup (kontrol), 3. grup (karpuz suyu) ve 7. grubun ($NaAsO_2$+karpuz suyu) aynı kiloda olduğu tespit edildi (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1. Sıçanların 14 gün ve 28 gün sonraki ortalama ağırlıkları. Veriler 14. gün için dört deney (n=4), 28. gün için altı deney (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı gündeki sonuçlarda kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.4.2. Biyokimyasal Analizler

Sıçanların kan serumlarında glukoz, trigliserid, kolesterol, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, total bilirubin ve albümin değerleri tayin edildi (Altaş ve ark. 2011). 14. ve 28. gün sonunda sakrifiye edilen sıçanların biyokimyasal değerleri Tablo 4.4.2.1-2'de verilmektedir.

Tablo 4.4.2.1. Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki kan şekeri (Glu), trigliserid (Trig) ve kolesterol (Chol) değerleri. Veriler dört deney (n=4) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı parametrede kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**Glu** (mg/dl)	**Trig** (mg/dl)	**Chol** (mg/dl)
Kontrol	112.67 ± 31.79	37.00 ± 12.17	26.00 ± 10.15[a]
NaCl + Şeker	82.00 ± 17.09	60.33 ± 18.15	14.00 ± 4.58[b]
Karpuz Suyu	119.33 ± 6.94	70.00 ± 50.69	26.00 ± 13.89[a]
Liyofilizat	73.00 ± 13.00	29.67 ± 1.16	15.00 ± 2.00[b]
Ticari Likopen	119.33 ± 32.87	43.67 ± 13.61	24.00 ± 8.54[a]
$NaAsO_2$	97.67 ± 3.79	55.33 ± 38.28	45.67 ± 18.45[c]
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	75.33 ± 9.07	55.00 ± 11.36	24.00 ± 6.93[a]
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	79.67 ± 27.15	57.00 ± 19.16	23.00 ± 8.54[a]
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	142.00 ± 14.00	96.00 ± 26.51	50.00 ± 5.00[c]

Tablo 4.4.2.1. (Devamı). Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki kan şekeri (Glu), trigliserid (Trig) ve kolesterol (Chol) değerleri. Veriler altı deney (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı parametrede kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**Glu** (mg/dl)	**Trig** (mg/dl)	**Chol** (mg/dl)
Kontrol	74.80 ± 44.80	39.00 ± 28.78	15.40 ± 10.74
NaCl + Şeker	68.40 ± 10.64	26.80 ± 8.67	14.80 ± 5.12
Karpuz Suyu	77.60 ± 7.04	22.80 ± 4.76	13.20 ± 4.44
Liyofilizat	103.40 ± 26.71	24.00 ± 10.56	18.20 ± 4.15
Ticari Likopen	114.80 ± 35.62	32.00 ± 7.21	22.20 ± 4.44
$NaAsO_2$	70.67 ± 4.04	27.67 ± 7.02	14.00 ± 3.46
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	87.00 ± 18.08	20.67 ± 6.03	16.33 ± 2.08
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	106.00 ± 14.42	30.67 ± 13.43	21.00 ± 3.00
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	81.00 ± 6.00	24.67 ± 2.52	12.00 ± 1.00

Tablo 4.4.2.2. Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin ve albümin değerleri. Veriler dört deney (n=4) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı parametrede kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

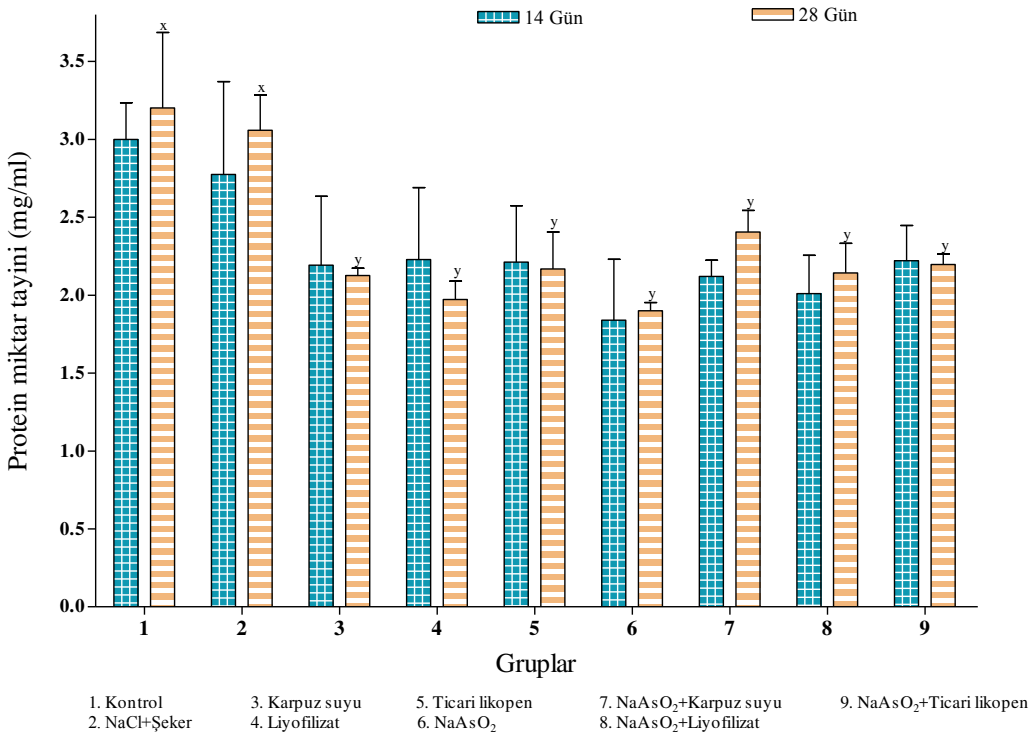
Gruplar	**AST** (U/l)	**ALT** (U/l)	**Alb** (g/dl)	**Bil-T** (mg/dl)
Kontrol	56.33 ± 5.3	22.33 ± 09.67	1.40 ± 1.00[a]	0.02 ± 0.06
NaCl + Şeker	32.00 ± 5.29	10.67 ± 2.08	1.92 ± 0.04[b]	0.05 ± 0.03
Karpuz Suyu	55.67 ± 70.12	18.67 ± 11.93	1.19 ± 1.24[a]	0.05 ± 0.05
Liyofilizat	31.33 ± 4.93	12.67 ± 2.89	1.19 ± 0.21[b]	0.09 ± 0.02
Ticari Likopen	56.67 ± 19.73	17.33 ± 4.04	1.80 ± 0.77[b]	0.07 ± 0.04
$NaAsO_2$	93.33 ± 32.59	29.67 ± 7.02	0.97 ± 0.39[a]	0.11 ± 0.01
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	36.00 ± 5.29	15.00 ± 3.00	1.39 ± 0.09[b]	0.07 ± 0.04
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	104.33 ± 79.95	31.67 ± 8.74	1.02 ± 0.22[b]	0.07 ± 0.05
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	105.00 ± 24.00	35.67 ± 7.51	2.55 ± 0.03[c]	0.11 ± 0.03

Tablo 4.4.2.2. (Devamı). Karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin ve albümin değerleri. Veriler altı deney (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı parametrede kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**AST** (U/l)	**ALT** (U/l)	**Alb** (g/dl)	**Bil-T** (mg/dl)
Kontrol	52.00 ± 55.50	18.20 ± 16.15	1.03 ± 0.55	0.02 ± 0.01
NaCl + Şeker	30.60 ± 7.89	13.20 ± 5.07	1.05 ± 0.26	0.02 ± 0.03
Karpuz Suyu	32.60 ± 8.79	12.80 ± 3.70	0.99 ± 0.18	0.01 ± 0.04
Liyofilizat	37.60 ± 10.81	18.00 ± 5.83	1.05 ± 0.36	0.02 ± 0.01
Ticari Likopen	48.60 ± 16.06	20.80 ± 8.41	1.82 ± 0.43	0.02 ± 0.00
$NaAsO_2$	76.67 ± 7.64	25.67 ± 4.93	0.82 ± 0.39	0.15 ± 0.01
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	36.33 ± 8.02	14.00 ± 5.29	1.31 ± 0.33	0.02 ± 0.01
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	51.67 ± 12.42	18.33 ± 4.16	1.83 ± 0.27	0.03 ± 0.02
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	22.67 ± 5.51	10.00 ± 1.00	0.99 ± 0.08	0.01 ± 0.00

4.4.3. Protein Miktar Tayini

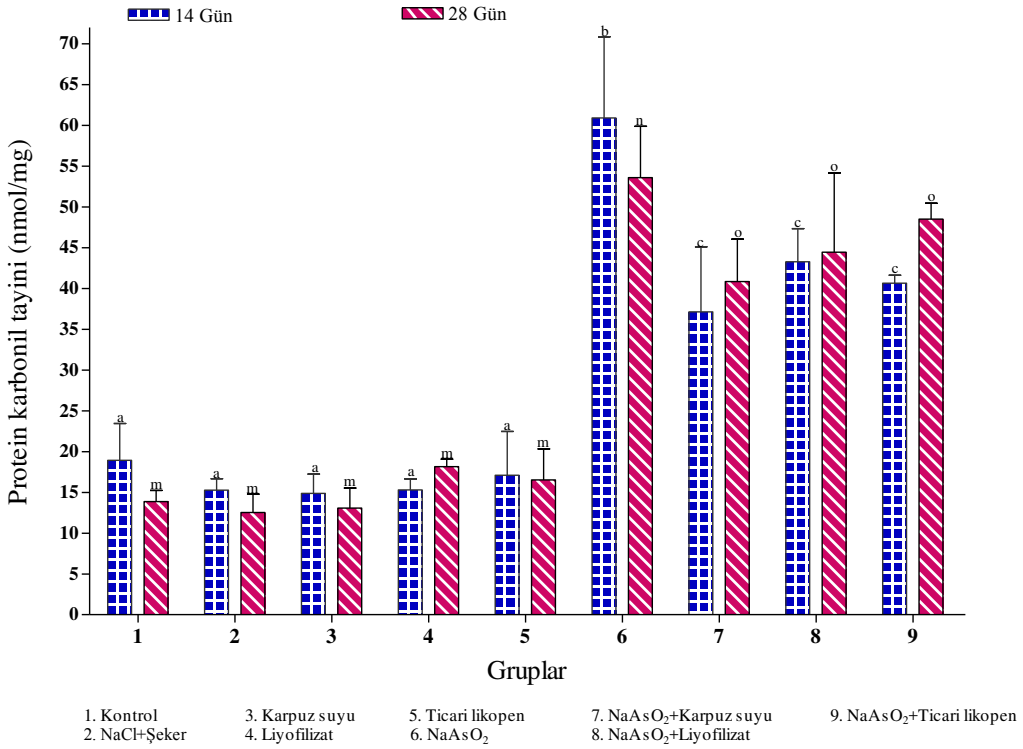
Sıçan karaciğer dokularındaki protein miktarı Hartree-Lowry Metodu ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951, Hartree 1972). BSA standart protein olarak kullanıldı. Karaciğer doku homojenatlarının protein miktarları Şekil 4.4.3 ve Tablo 4.4.5.1-2'de verilmektedir.



Şekil 4.4.3. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün ve 28 gün sonraki protein miktar tayini. Veriler 14. gün için dört deney (n=4), 28. gün için altı deney (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı gündeki sonuçlarda kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.4.4. Protein Karbonil Miktar Tayini

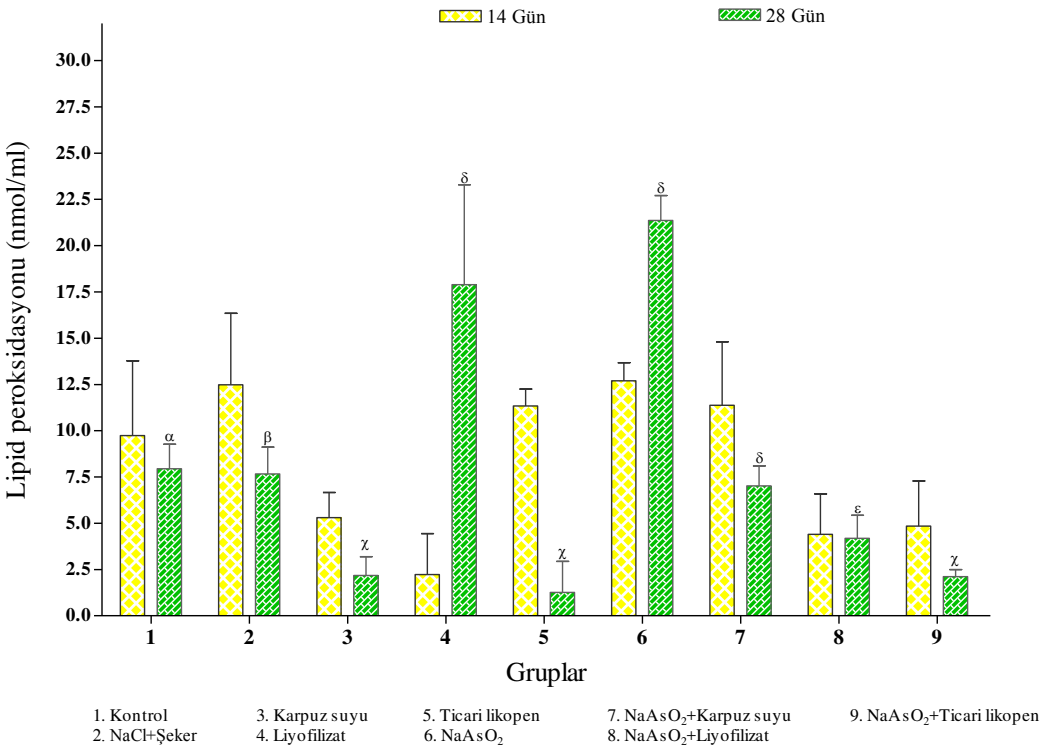
Sıçan karaciğer dokularındaki oksidatif stres sonucu oluşan protein karbonil miktarı Levine ve ark. (1990)'nın metoduna göre spektrofotometrik olarak süpernatantın 370 nm'de absorbansının ölçülmesi ile tayin edildi (Şekil 4.4.4 ve Tablo 4.4.5.1-2).



Şekil 4.4.4. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün ve 28 gün sonraki protein karbonil miktar tayini. Veriler 14. gün için dört deney (n=4), 28. gün için altı deney (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı gündeki sonuçlarda kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

4.4.5. Lipid Peroksidasyonu

Sıçan karaciğer dokusunda oluşan lipid peroksidasyonu; aldehit ürünlerinden olan MDA miktarının 535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanılarak tayin edildi (Sahreen ve ark. 2011). Standart olarak TMP kullanıldı. Karaciğer doku homojenatındaki MDA miktarı nmol MDA/TMP eşdeğeri cinsinden hesaplandı (Denklem 17, Şekil 4.4.5. ve Tablo 4.4.5.1-2)



Şekil 4.4.5. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün ve 28 gün sonraki MDA tayini. Veriler 14. gün için dört deney (n=4), 28. gün için altı deney (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı gündeki sonuçlarda kullanılan farklı üst simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Tablo 4.4.5.1. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki ortalama vücut ağırlıkları ile bütün gruplarda sıçan karaciğer dokularının 14 gün sonraki protein miktarı, protein karbonil miktarı ve lipid peroksidasyonu analizi. Veriler dört sıçan ve dört deneysel doku (n=4) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı deneysel verilerde üst simge olarak verilen farklı simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**Sıçan Ağırlığı** (g/sıçan)	**Protein Miktar Tayini** (mg/ml homojenat)	**Protein Karbonil Miktarı** (nmol/mg protein)	**Lipid Peroksidasyonu** (nmol/ml homojenat)
Kontrol	270.00 ± 15.00^{a}	2.99 ± 0.24	18.95 ± 4.50^{m}	9.74 ± 4.04
NaCl + Şeker	263.50 ± 22.78^{a}	2.78 ± 0.60	15.29 ± 1.40^{m}	12.48 ± 3.86
Karpuz Suyu	291.00 ± 14.73^{b}	2.19 ± 0.44	14.87 ± 2.39^{m}	5.30 ± 18.36
Liyofilizat	288.33 ± 10.26^{b}	2.23 ± 0.46	15.30 ± 1.34^{m}	2.23 ± 2.21
Ticari Likopen	269.33 ± 18.01^{a}	2.21 ± 0.36	17.10 ± 5.39^{m}	11.34 ± 0.91
$NaAsO_2$	218.33 ± 14.05^{c}	1.84 ± 0.39	$63.\ 94 \pm 9.93^{x}$	12.70 ± 0.98
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	235.33 ± 13.65^{d}	2.12 ± 0.10	37.15 ± 7.98^{n}	11.38 ± 8.43
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	214.00 ± 14.93^{c}	2.01 ± 0.25	43.29 ± 4.06^{n}	4.40 ± 2.18
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	282.00 ± 6.25^{b}	2.22 ± 0.23	40.65 ± 0.97^{n}	4.85 ± 2.43

Tablo 4.4.5.2. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki ortalama vücut ağırlıkları ile bütün gruplarda sıçan karaciğer dokularının 28 gün sonraki protein miktarı, protein karbonil miktarı ve lipid peroksidasyonu analizi. Veriler altı sıçan ve altı deneysel doku (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı deneysel verilerde üst simge olarak verilen farklı simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**Sıçan Ağırlığı** (g/sıçan)	**Protein Miktar Tayini** (mg/ml homojenat)	**Protein Karbonil Tayini** (nmol/mg protein)	**Lipid Peroksidasyonu** (nmol/ml homojenat)
Kontrol	303.75 ± 6.18^{a}	3.20 ± 0.48^{x}	13.88 ± 1.37^{m}	$7.95 \pm 1.32^{\alpha}$
NaCl + Şeker	308.00 ± 9.49^{b}	3.06 ± 0.23^{x}	12.54 ± 2.24^{m}	$7.67 \pm 1.45^{\beta}$
Karpuz Suyu	303.00 ± 22.17^{a}	2.83 ± 0.05^{y}	13.07 ± 2.47^{m}	$2.18 \pm 1.02^{\chi}$
Liyofilizat	312.75 ± 9.07^{b}	1.97 ± 0.12^{y}	18.17 ± 0.90^{m}	$17.89 \pm 5.40^{\delta}$
Ticari Likopen	311.75 ± 6.02^{b}	2.17 ± 0.24^{y}	16.55 ± 3.80^{m}	$1.26 \pm 1.68^{\chi}$
$NaAsO_2$	277.67 ± 4.92^{c}	1.90 ± 0.05^{y}	57.89 ± 6.27^{x}	$21.37 \pm 1.33^{\delta}$
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	305.67 ± 4.50^{b}	2.41 ± 0.14^{y}	40.87 ± 5.19^{n}	$7.02 \pm 1.08^{\delta}$
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	255.75 ± 9.54^{d}	2.14 ± 0.19^{y}	$44.46 \pm 9,73^{n}$	$4.19 \pm 1.24^{\varepsilon}$
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	268.75 ± 17.23^{d}	2.20 ± 0.07^{y}	48.52 ± 1.94^{n}	$2.12 \pm 0.38^{\chi}$

4.4.6. Katalaz Aktivitesi Tayini

Sıçan karaciğer homojenatının katalaz aktivitesi spektrofotometrik metot ile tayin edildi (Chance ve Maehly 1955). Enzim aktivitesi H_2O_2'in 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (39.4 mM/cm) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar bir dakikada hem katalaz aktivitesi (U/ml) hem de spesifik katalaz aktivitesi (U/mg) olarak Denklem 18 ve Denklem 19 kullanılarak hesaplandı. (Tablo 4.4.6.1-2).

Tablo 4.4.6.1. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 14 gün sonraki katalaz aktivitesi ve spesifik katalaz aktivitesi. Veriler dört deneysel doku (n=4) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı deneysel verilerde üst simge olarak verilen farklı simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**Katalaz**	
	Aktivite (U/ml homojenat)	**Spesifik aktivite** (U/mg protein)
Kontrol	28.538 ± 4.90	9.583 ± 1.94
NaCl + Şeker	21.627 ± 5.03	8.379 ± 4.10
Karpuz Suyu	20.223 ± 6.80	9.834 ± 5.17
Liyofilizat	24.479 ± 3.58	11.544 ± 4.11
Ticari Likopen	28.224 ± 5.61	13.233 ± 4.40
$NaAsO_2$	27.871 ± 3.93	13.526 ± 3.93
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	25.302 ± 1.90	11.960 ± 1.14
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	31.049 ± 2.44	15.529 ± 1.21
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	30.314 ± 1.43	13.702 ± 0.76

Tablo 4.4.6.2. Sıçan karaciğer dokularının karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının 28 gün sonraki katalaz aktivitesi ve spesifik katalaz aktivitesi. Veriler altı deneysel doku (n=6) sonucunun ortalamasıdır ve standart sapmalar (±SD) hesaplanarak verilmiştir. Aynı deneysel verilerde üst simge olarak verilen farklı simgeler sonuçlar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$)

Gruplar	**Katalaz**	
	Aktivite (U/ml homojenat)	**Spesifik aktivite** (U/mg protein)
Kontrol	30.908 ± 1.58^{a}	11.321 ± 1.93^{x}
NaCl + Şeker	25.458 ± 1.19^{b}	9.390 ± 2.23^{x}
Karpuz Suyu	21.530 ± 2.33^{c}	9.312 ± 1.70^{y}
Liyofilizat	18.577 ± 1.86^{d}	8.871 ± 1.16^{y}
Ticari Likopen	27.798 ± 3.29^{b}	11.808 ± 1.89^{x}
$NaAsO_2$	24.887 ± 2.12^{e}	11.191 ± 0.70^{x}
$NaAsO_2$ + Karpuz Suyu	27.139 ± 1.44^{b}	11.309 ± 0.78^{x}
$NaAsO_2$ + Liyofilizat	29.316 ± 5.86^{f}	13.871 ± 3.78^{z}
$NaAsO_2$ + Ticari Likopen	24.751 ± 0.88^{e}	11.285 ± 0.76^{x}

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. *İn Vitro* Metotlar

5.1.1. Toplam Fenolik Bileşen, Flavonoid Bileşen ve Likopen Miktar Tayini

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkisel bileşenlerdir. Günümüzde 8000 taneden fazla fenolik yapı tanımlanmıştır. Fenoliklerin antioksidan kapasitelerinden kaynaklanan iyi etkileri insan sağlığı açısından dikkat çekmektedir (Kim, Matsushita ve ark. 2014). Yapılan çalışmalarda fazla sebze ve meyve tüketiminin sağlık açısından yarar sağladığı, bunun da doğal gıdalarda bulunan karotenoid, flavonoid, fenolik bileşikler ve vitaminler gibi antioksidan bileşenlerden kaynakladığı rapor edilmektedir (Oms-Oliu[b] ve ark. 2009).

Likopen en önemli karotenoid bileşiklerdendir. Polien yapısından dolayı elektronca zengin bir sistem oluşturur, elektrofilik tepkimeler için uygun bir hedef haline gelir. Bundan dolayı, oksijen ve serbest radikallere karşı oldukça reaktiftir. Molekül yapısında β-iyonon halkasının bulunmaması oksijen yakalama aktivitesini arttırmaktadır. Bununla birlikte, likopen serbest radikal söndürücü olarak güçlü bir antioksidan ve karotenoidler arasında en etkili singlet oksijen süpürücüdür (Kim, Park ve ark. 2014).

Yeni hasat edilmiş Diyarbakır karpuzu yıkandı, dilimlendi, kabuk ve çekirdek kısımları ayrıldı. Karpuzun meyve kısmı küçük parçalar halinde doğranıp elle yoğrulmak suretiyle ezildi, suyu temiz patiska bezi yardımıyla süzüldü (Resim 3.2.1.1). Elde edilen taze karpuz suyunun pH değeri 5.20 ± 0.05 olarak ölçüldü. Bu işlemden sonra, taze karpuz suyunun bir kısmı deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere uygun hacimlerde dondurucuya (-20 ^{o}C) bırakıldı, geriye kalan diğer bir kısım ise liyofilizatörde kurutulduktan sonra tartıldı ve -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

Karpuz suyunda bulunan toplam fenolik, flavonoid ve likopen içeriği sırasıyla; 2490.00 ± 2.14 µg GAE/ml, 9.84 ± 1.50 µg QUE/ml ve 88.61 ± 0.17 mg/kg olarak tespit edildi. Bununla birlikte, liyofilizatta bulunan toplam fenolik, flavonoid ve likopen içeriği 69.93 ± 13.53 µg GAE/mg, 0.23 ± 0.34 µg QUE/mg ve 88.28 ± 3.92 mg/kg bulundu. Karpuz suyunun toplam fenolik ve flavonoid bileşen miktarı ile liyofilizatta

bulunan toplam fenolik ve flavonoid miktarı arasında büyük fark olduğu, likopen içeriklerinin ise hemen hemen aynı olduğu tespit edildi (Tablo 4.1.1).

Kim, Park ve ark.(2014)'ın yaptığı çalışmada, karpuz suyunda bulunan toplam fenolik, flavonoid ve likopen içerikleri sırasıyla; 1.10 µg GAE/mg, 0.14 µg QUE/mg ve 113 mg/kg, olarak bulunmuştur.

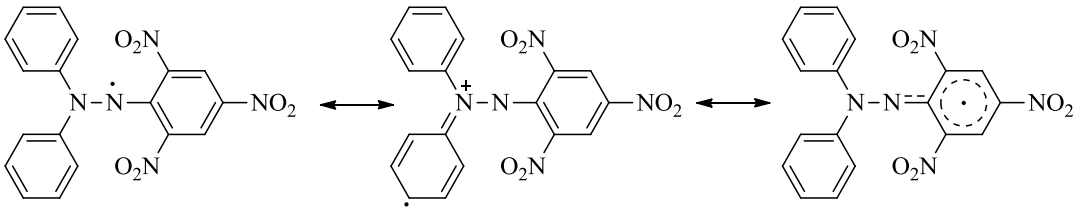
Tlili ve ark. (2011) marketlerde satılan altı karpuz çeşidinin toplam fenolik miktarını 0.09-0.147 µg GAE/mg, flavonoid miktarını 0.11-0.176 µg QUE/mg ve likopen miktarını 42.7-102.4 mg/kg aralıklarında rapor etmişlerdir.

Kim, Matsushita ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışmada, karpuzun kırmızı kısmının toplam fenolik bileşen miktarı 0.253 ± 4.75 µg GAE/mg, likopen içeriği 60.68 ± 0.74 mg/kg olarak bulunmuştur. Ayrıca, süre ve sıcaklığa bağlı olarak fenolik bileşen miktarı artarken, likopen içeriğinin ise azaldığı ve yüksek sıcaklıklarda tespit edilemediği rapor edilmektedir. Bu durum, çözünür olmayan fenolik bileşiklerin ısıl işlem ile çözünür hale getirildiği diğer taraftan, ısı ve yüksek basıncın likopenin izomerizasyonunu indüklediği ve uçucu bileşiklere parçaladığı şeklinde açıklanmaktadır.

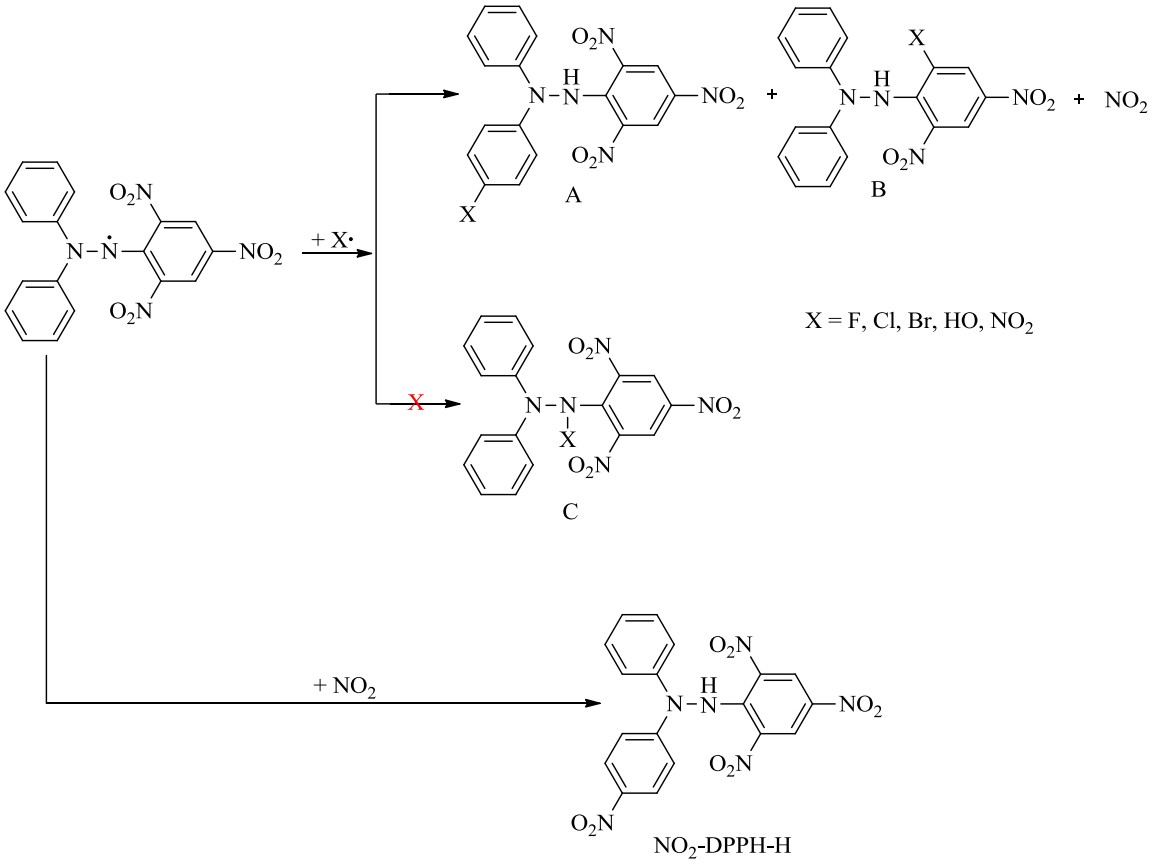
Tlili ve ark. (2011), Kim, Park ve ark. (2014) ile Kim, Matsushita ve ark. (2014) gruplarının yaptığı çalışmalarda karpuz içeriğinde bulunan fenolik ve flavonoid bileşen miktarları Diyarbakır karpuzuna göre oldukça düşük, likopen içeriği ise yakın bulunmuştur. Diyarbakır karpuzunun kendine has yetiştirilme yöntemi, hibrit olmaması, stress durumu ve iklim koşullarının bu bileşiklerin miktarını etkilediğini düşünmekteyiz.

5.1.2. DPPH ve ABTS Radikal Söndürme Aktivitesi

DPPH kararlı serbest radikali antioksidan aktiviteyi belirlemek için substrat olarak kullanılan bir bileşiktir. DPPH radikalleri azotun kararsız yapısından dolayı hidrojen atomunu kolaylıkla kabul eder (Şekil 5.1.1). Antioksidan bileşiklerde bulunan zayıf X-H bağının kırılıp hidrojen atomunun DPPH tarafından kabul edilmesiyle mor renk şiddetinde bir azalma görülür ve bu azalmadan antioksidan aktivite ölçülür (Şekil 5.1.2) (Amarowicz ve ark. 2004, Kim, Matsushita ve ark. 2014).



Şekil 5.1.1. Kararlı serbest radikal DPPH yapısı (Ionita 2005)



Şekil 5.1.2. DPPH molekülünün serbest radikal X ile tepkimesi, ana ürün NO_2-DPPH-H'dır (Ionita 2005)

Radikal söndürme aktiviteleri serbest radikallerin biyolojik sistemler ve gıdalardaki zararlı etkilerinden dolayı önemlidir. Serbest radikallerin aşırı oluşumu gıdalarda lipid oksidasyonunu hızlandırır ve gıda kalitesini düşürür. Yaptığımız bu çalışmada karpuz suyu (5-150 µl/ml), liyofilizat (5-150 µg/ml) ve pozitif kontrollerin (BHA, BHT) (5-150µg/ml) artan derişimlerine bağlı olarak DPPH radikalini söndürme

aktiviteleri test edildi. Konsantrasyon artışına bağlı olarak % inhibisyon değerlerinin de yükseldiği gözlendi. Çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 150 µl/ml ve 150 µg/ml'de karpuz suyu %43.965 ± 0.68 inhibisyon gösterirken liyofilizat %57.333 ± 5.56 inhibisyon gösterdi. Diğer taraftan, BHA ve BHT sırasıyla %89.818 ± 2.61 ve %89.547 ± 1.63 inhibisyon gösterdi. BHA ve BHT için istatistiksel olarak birbirine benzer radikal söndürme aktivitesi ölçüldü. Karpuz suyu ve liyofilizat için tespit edilen aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p \leq 0.05$). Ayrıca, BHA ve BHT ile karpuz suyu veya liyofilizatın aktiviteleri arasında anlamlı farklılık mevcuttur (Tablo 4.1.2, Şekil 4.1.2).

DPPH deneyinde, karpuz suyu ve liyofilizat serbest radikal DPPH'yı sarı renkli difenil pikrildihrazin kararlı radikaline dönüştürdü. Bu metotda hidrojen donörü antioksidanlar varlığında metanolde hazırlanan DPPH çözeltisinin indirgenmesine bağlı olarak radikal olmayan DPPH-H formu oluştu. Karpuz suyu ve liyofilizatın antiradikal aktivitesi DPPH radikalinin 517 nm dalga boyundaki absorbansının düşmesinden hesaplandı.

Kim, Park ve ark. (2014) karpuz suyundan ekstrakte edilen likopenin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi; konsantrasyonu %0.02 ve %0.04 olan çözeltilerde ölçülmüş, aktivitenin konsantrasyona bağlı olarak iki katına çıktığı tespit edilmiştir. Domatesten izole edilen ticari likopenin (pozitif kontrol) aktivitesi oldukça düşük ölçülmüştür.

Kim, Matsushita ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada karpuzun % DPPH radikalini söndürme aktivitesini 100 µg/ml'de 10.80 ± 0.13 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, artan sıcaklıklarda ısıl işlem gören numunelerde zamanla aktivitenin de yükseldiği gözlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise, karpuz suyu 100 µl/ml'de %43.349 ± 1.74 ve liyofilizat 100 µg/ml'de %49.733 ± 2.27 inhibisyon gösterdi.

Yaptığımız bu çalışmada, karpuz suyu ve liyofilizatın test edilen konsantrasyonlarında % DPPH radikalini söndürme aktivitesinin yüksek olduğu gözlendi.

Antioksidan molekül veya herhangi bir indirgeyici etken X, 600-750 nm dalga boyunda güçlü absorbsiyon bandı bulunan karbon merkezli, renkli ve kararlı bir radikal

olan $ABTS^{\bullet+}$ ile etkileşir. Renk şiddetindeki azalma pozitif kontrol (troloks, askorbik asit, quercetin, BHT) ile karşılaştırılır (Amorati ve ark. 2013).

ABTS sistemi; birçok bitkisel özütte zincir kırıcı antioksidanların (lipid peroksil radikal söndürücüler) ve hidrojen verici antioksidanların (sulu faz radikal söndürücüler) radikal söndürme aktivitelerini ölçmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Leong ve Shui 2002, Kim, Matsushita ve ark. 2014).

Karpuz suyu (5-100 µl/ml), liyofilizat (5-100 µg/ml) ve pozitif kontrollerin (troloks, askorbik asit, quercetin, BHT) (5-100 µg/ml) artan derişimlerine bağlı olarak % ABTS serbest radikal süpürme etkisi araştırıldı. Konsantrasyon artışına bağlı olarak % inhibisyon değerlerinin de yükseldiği gözlendi. Çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 100 µl/ml'de karpuz suyu %90.008 ± 0.12 inhibisyon gösterirken 100 µg/ml'de liyofilizat %7.013 ± 1.58 inhibisyon gösterdi. Diğer taraftan, troloks, askorbik asit, quercetin ve BHT sırasıyla; %99.607 ± 0.44, %99.560 ± 0.32, %99.084 ± 0.87 ve %63.467 ± 12.56 inhibisyon gösterdi. Bu konsantrasyonda, pozitif kontroller ve karpuz suyu benzer inhibisyon etkisi gösterirken liyofilizat istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.1.3, Şekil 4.1.3).

Kim, Matsushita ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada karpuzun % ABTS radikalini söndürme aktivitesini 100 µg/ml'de 15.09 ± 0.76 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca DPPH radikalinde olduğu gibi ABTS radikalini söndürme aktivitesinde de artan sıcaklıklarda ısıl işlem gören numunelerde zamanla aktivitenin de yükseldiği gözlenmiştir.

Leong ve Shui (2002) Singapur'daki marketlerde satılan bazı meyve posalarının ABTS serbest radikalini söndürme aktivitelerini araştırmaları sonucu karpuzun 100 gramının 11.9 ± 0.1 mg L-askorbik aside eşdeğer antioksidan kapasite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Vijaya Kumar Reddy ve ark. (2010) ise Hindistan'da yaygın olarak yaş ve kuru tüketilen meyvelerin antioksidan aktivitelerini araştırmışlar; 100 gram taze karpuzun ABTS radikalini söndürme aktivitesi 23 ± 3.8 mg troloksa eşdeğer bulunmuştur.

Diyarbakır karpuzunun hem % DPPH hem de % ABTS radikalini söndürme aktivitesi Leong ve Shui (2002), Kim, Matsushita ve ark. (2014) ile Kim, Park ve ark. (2014)'n çalışmalarında elde edilen sonuçlardan daha yüksektir.

5.1.3. İndirgeme Gücü

İndirgeme gücü, Fe^{3+}/ferrisiyanür kompleksinin antioksidan varlığında Fe^{2+}'ye indirgenmesine dayanmakta olup potansiyel antioksidan aktivitenin önemli bir göstergesidir (Meir ve ark. 1995).

Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu (Tepkime 11) sonucu hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$) oluşumu katalizlenir.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + {}^{-}OH \qquad (11)$$

Hidroksil radikalinin biyolojik sistemlerdeki tepkimeleri:

a) Elektron transfer tepkimeleri,

b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri (Hidroksil radikali organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgenir),

c) Katılma tepkimeleridir (Pürin ve pirimidin bazları ile aromatik asitler gibi elektronca zengin moleküllerle gerçekleşir).

Bu tepkimeler, $^{\cdot}OH$'ın dış orbitalindeki ortaklanmamış elektronundan kaynaklanmaktadır.

Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Ayrıca nükleik asitler ve proteinlerde de radikalik zincir tepkimelerine yol açar (Akkuş 1995).

İndirgeme gücü; farklı bitki örneklerinin önemli antioksidan aktivite göstergesidir. Bu aktiviteyi gösteren bileşikler elektron donörüdür ve lipid peroksidasyonu sürecinde oluşan oksitlenmiş ara ürünleri indirgeme kapasitesine sahiptir (Barbunsinski 2009).

Liyofilizat varlığında Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme gücü araştırıldı. BHA, BHT ve α-tokoferol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Liyofilizat, BHA, BHT ve α-tokoferolün 100 µg/ml konsantrasyonda indirgeme gücü sırasıyla; 0.058 ± 0.00, 0.723 ± 0.09, 0.553 ± 0.06 ve 0.690 ± 0.03 olarak ölçüldü. Bu çalışmada, sarı renkli test çözeltisi antioksidan numunelerin indirgeme gücüne bağlı olarak mavi ve yeşilin çeşitli tonlarına

dönüştü. Söz konusu 100 µg/ml konsantrasyonda, BHA ve BHT'nin gösterdiği indirgeme gücü seviyeleri arasında istatistiksel açıdan fark yok iken, aynı konsantrasyonda liyofilizat ve α-tokoferol arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmuştur ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.1.4, Şekil 4.1.4).

Kim, Matsushita ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, 100 µg/ml'de karpuzun indirgeme gücü 0.003 ± 0.00 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, ısıl işlem 200 ^{o}C üstüne çıkartıldığında artan süreye bağlı olarak indirgeme gücü yükselmiştir.

Müller ve ark. (2011) karoten grubu içinde sadece likopenin etkili indirgen bir bileşik olduğunu açıklamışlardır. Ferrik indirgeme aktivitesinin büyük oranda konjuge çift bağ sisteminin boyutundan etkilendiği rapor edilmektedir. Likopenin indirgeme gücünü konjuge çift bağları aracılığıyla oluşan kararlı karotenoid radikal sağlar.

Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi antioksidan antivitesinin önemli bir göstergesidir. Liyofilizatın indirgeme gücünün düşük olmasının çalışılan konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 µg/ml) çözeltide bulunan likopen içeriğinin düşük olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

5.1.4. Metal Şelatlama Aktivitesi

Geçiş metalleri canlı organizmalarda ROT üretiminde önemli rol oynar. Demir yüksek etkinliğinden dolayı bu geçiş metallerinden en önemlisidir ve iki farklı oksidasyon formunda bulunmaktadır. Bu formlar; ferröz (Fe^{2+}) iyon ve biyolojik olarak oldukça etkisiz olan ferrik (Fe^{3+}) iyondur. Ferik iyon pH, Fenton tipi tepkimeler ve Haber-Weiss zincir tepkimeleri durumuna bağlı olarak Fe^{2+}'ye indirgenir ve ROT oluşturur (Tepkime 11-12). Demirin Fe^{2+} hali Fenton tepkimesi aracılığıyla hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini reaktif serbest radikallere parçalayarak lipid oksidasyonunu hızlandırır. Aynı zamanda, Fe^{3+} iyonu peroksitlerden radikal oluşturur, fakat bu tepkimenin gerçekleşme oranı Fe^{2+}'den on kat daha düşüktür. Çeşitli metal iyonları arasında Fe^{2+} iyonu en güçlü pro-oksidandır. Bu radikallerin oluşumu lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA hasarına yol açar. Metal şelatlayıcılar metal iyonlarını etkisizleştirirler ve metale bağlı süreçleri durdururlar. Demir şelatlama ajanlarının metale bağlı oksidatif süreçleri durdurması reaktif oksijen türlerine bağlı hastalıklarla mücadele etmek açısından önemlidir (Gülçin 2006, Habtemariam 2007).

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + {}^{\cdot}OH \qquad (12)$$

Bir metalle σ-bağı oluşturan şelatlama ajanları ikincil antioksidanlar gibi etkilidir, çünkü bunlar redoks potansiyelini düşürerek demirin oksijen moleküllerine ulaşmasını engelleyebilir, böylece Fe^{2+} iyonu Fe^{3+} iyonuna dönüştürülür ve oksidatif hasar durdurulur. Ayrıca, flavonoid olmayan polifenolikler demiri indirger ve ardından inert olan Fe^{2+}-polifenol kompleksleri oluşturmaktadır (Kumaran ve Karunakaran 2007, Singh ve ark. 2007). Fenoliklerin metal şelatlama özellikleri genellikle UV-VIS absorpsiyon spektroskopisinde UV bantlarındaki kaymaları değerlendirilerek tespit edilir (Habtemariam 2007).

Uygun konfigürasyonlardaki -OH, -SH, -COOH, $-PO_3H_2$, C=O, $-NR_2$, -S- ve -O- fonksiyonel gruplarından iki veya daha fazlasını bulunduran bileşikler metal şelatlama aktivitesi göstermektedir (Gülçin 2006).

Yaptımız çalışmada, karpuz suyunun 1 ml'nin metal şelatlama aktivitesi %8.629 ± 0.509 iken 1 mg/ml liyofilizatın %12.891 ± 2.71 olarak tespit edildi (Tablo 4.1.5).

Choo ve Sin (2012) yaptıkları çalışmada, çekirdekli karpuzun iki çeşidi olan kırmızı ve sarı etli karpuzların bütün karpuz ve etli kısımlarının metal şelatlama aktivitesini %2.94 ± 0.27- %27.90 ± 8.82 aralığında tespit etmişlerdir. Sarı etli karpuzun bütün kısmının aktivitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmektedir. Bu çalışmada belli konsantrasyonlar kullanılmamıştır, en yüksek aktivite izlenen konsantrasyonlar anlamlı bulunmuştur. Yaptığımız çalışmaya benzer olarak, 928.85 mg/ml konsantrasyonda kırmızı etli kısımda %8.21 ± 1.34 aktivite tespit edilirken, 969.27 mg/ml konsantrasyonda sarı etli kısımda %25.68 ± 7.76 aktivite ölçülmüştür.

Metal iyonları önemli biyolojik moleküllerin oksidasyonunu fenton reaksiyonu ile hızlandırır. Fenton reaksiyonu lipid peroksidasyonunu uyarıp lipid hidroperoksitleri radikallere parçalar ve bu radikaller zincir reaksiyonunu yayar. Metal şelatlama aktivitesi yüksek olan bileşikler fenton reaksiyonunu yavaşlatırlar. Karpuz suyu ve liyofilizatın Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi göstermesi oksidatif hasara karşı koruma anlamında umut vericidir.

5.1.5. Hidroksil Radikalini Söndürme Aktivitesi

Fenton reaksiyonu ile oluşan OH radikali oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Bu radikal aynı zamanda H_2O_2, O_2 radikali ve insan vücudunda meydana gelen fizyolojik durumlarda da meydana gelmektedir. OH radikali aromatik bileşiklerle etkileştiğinde çift bağ oluşur ve bunun sonucunda başka ROT meydana gelir (Zhao ve ark. 2014).

Hidroksil radikalinin hücre zarı akışkanlığı ile enzim ve reseptör aktivitesinin bozulmasına sebep olan ve apoptozise yol açan lipid peroksidasyonunda rol aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, hidroksil radikali eğer nükleik asitlerin yanında oluşursa, pürin ve purimidin bazları ve deoksiribozla etkileşip mutasyon ve kansere neden olmaktadır (Debbache ve ark. 2014).

Karpuz suyunun hidroksil radikalini söndürme aktivitesi deoksiriboz metodu ile Fe^{2+}/ askorbat/ EDTA/ H_2O_2 sistemine göre incelendi. Karpuz suyunun 1 ml'sinde % hidroksil radikalini söndürme aktivitesi 59.336 ± 3.07 olarak bulundu.

Oboh ve ark. (2015) karpuz suyu liyofilizatının OH radikalini söndürme aktivitesini IC_{50} değerini µg/ml'de 34.27 ± 0.19 olarak tespit etmişlerdir.

5.1.6. Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesi

Hidrojen peroksit çok reaktif değildir fakat, bazen metal iyonlarıyla (Fe^{2+}, Cu^{2+}) etkileşip hücrelerde hidroksil radikallerinin artmasına öncülük edip toksik olmaktadır. Bu durumda, tiyol gruplarının oksidasyonunu hızlandırır, enzim aktivitesini doğrudan durdurur ve hücre membranını geçip hücrede oksidasyonu başlatır. Bundan dolayı, H_2O_2'in hücre veya besinsel sistemlerden uzaklaştırılması antioksidan savunma açısından hem insan sağlığı hem de ilaç ve yiyeceklerin korunması için oldukça önemlidir (Sen ve ark. 2013).

Bu çalışmada, karpuz suyu ve liyofilizatn hidrojen peroksit süpürme aktivitesi tespit edildi. Karpuz suyu (50-1000 µl/ml), liyofilizat (50-1000 µg/ml) ve askorbik asidin (50-1000 µg/ml) % hidrojen peroksit süpürme aktivitesi titrasyon ile araştırıldı. Çalışılan konsantrasyon aralığında karpuz suyu 27.418 ± 0.61-100.000 ± 0.00, liyofilizat 0.854 ± 0.06-18.789 ± 0.19 ve askorbik asit 0.106 ± 0.00-100.000 ± 0.00

arasında etki gösterdi. Karpuz suyu 100 µl'de %48.248 ± 0.21 hidrojen peroksit süpürme aktivitesi gösterirken, 100 µg askorbik asit ve liyofilizat için %15.529 ± 0.92 ve %1.990 ± 1.83 aktivite hesaplandı ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.1.7, Şekil 4.1.7).

Bu çalışmada, 1 mg askorbik asidin gösterdiği H_2O_2 söndürme aktivitesi 350 µl kar*p*uz suyu aktivitesine eşdeğer olarak tespit edildi. Bununla birlikte, karpuz suyu 350 µl/ml konsantrasyona kadar artan, sonra da sabit kalan bir değer gösterirken; liyofilizat 350 µg/ml konsantrasyondan sonra da konsantrasyona bağımlı bir artış göstermektedir. Liyofilizat ve karpuz suyunun gösterdikleri hidrojen peroksit süpürme aktivitelerinin benzer ölçülmemesinin nedeninin içerdikleri toplam fenolik bileşik miktarının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Karpuzun hidrojen peroksit süpürme aktivitesi H_2O_2'ye elektron veren fenolik bileşik miktarıyla ilişkilendirilebilir. Elde edilen mevcut sonuçlara göre, karpuz suyu ve liyofilizat yiyeceklerde ve insanlar için iyi bir H_2O_2 süpürücü olarak kullanılabilir (Aydemir ve Becerik 2011).

5.1.7. Vitamin ve Şeker Tayini

A vitamini (retinol) vücut için esansiyel olan besin kaynaklarındandır. Görme, bağışıklık, büyüme ve üreme fonksiyonları için gereklidir. Meyvelerde provitamin A olarak bulunan bir karotenoitdir.

E vitamini tokoferoller ($\alpha, \beta, \chi, \delta$) ve tokotrienollerin ($\alpha, \beta, \chi, \delta$) toplamı olup antioksidan aktivite göstermektedir. E vitamininin meyvelerde en bol bulunan ve biyolojik olarak aktif formu α-tokoferoldür (Chun ve ark. 2005).

Karpuz suyu ve liyofilizatta A, D ve E vitaminleri ile fruktoz, glukoz ve sukroz analizleri HPLC ile yapıldı. Vitamin analizi için Nucleosil 120-5 C18, 250 x 4.6 mm kolonu ve şeker analizi için Supelco, Supelcosil LC-NH_2 5 µm, 250x4.6 mm kolunu kullanıldı. Karpuz suyunda vitamin D ve E, liyofilizatta ise sukroz tespit edilmedi.

Yapılan bu çalışmada, karpuz suyu ve liyofilizatta tayin edilen A vitamini içeriği sırasıyla; 0.23 µg/ml ve 0.56 µg/g'dır. Liyofilizatta tespit edilen D ve E vitamini miktarı ise 3.60 ve 3770 µg/g'dır. Isabelle ve ark. (2010) taze kırmızı ve sarı karpuzların toplam karotenoid ve E vitamini içeriğini araştırmaları sonucu karotenoid içeriklerini sırasıyla;

14.03 ve 0.92 µg/g, E vitamini içeriğini ise sırasıyla; 0.47 ve 0.53 µg/g olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, α-tokoferol ise 0.43 ve 0.49 µg/g bulunmuştur.

Mevcut çalışmadan elde edilen bulgulara göre karpuz suyunda tespit edilen fruktoz, glukoz ve sukroz değerleri sırasıyla şöyledir; 18784, 235 ve 229 µg/ml. Liyofilizatta tespit edilen fruktoz ve glukoz değerleri sırasıyla şöyledir; 1268.2 ve 1042.5 mg/g'dır. Bu verilerden karpuz suyunun toplam şeker içeriği 19248 µg/ml, liyofilizatın ise 2310.7 mg/g olarak hesaplandı (Tablo 4.1.8). Oboh ve ark. (2015) karpuz suyu liyofilizatının şeker içeriğini 455.5 ± 0.5 mg/g olarak tespit etmişlerdir.

Karpuz suyu, liyofilizat ve limon suyunun (pozitif kontrol) C vitamini içeriği titrasyonla tayin edildi. Karpuz suyu 0.323 ± 0.05 mg AscAE/ml ve pozitif kontrolde 0.469 ± 0.10 mg AscAE/ml, liyofilizatta ise 4.697 ± 2.03 mg AscAE/g C vitamini tayin edildi ($p\leq$ 0.05) (Tablo 4.1.9). Isabelle ve ark. (2010) taze kırmızı ve sarı karpuz örneklerinde C vitamini içeriğini 0.039 ve 0.055 mg AscAE/g olarak tespit etmişlerdir. Choo ve Sin (2012) kırmızı karpuzun etinde 0.086 mg/g ve sarı karpuzun etinde 0.052 mg/g C vitamini tayin ettiklerini bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, karpuz suyu ve liyofilizatın vitamin (A, D, E, C) ve şeker içerikleri Isabelle ve ark. (2010), Oboh ve ark. (2015) ile Choo ve Sin (2012)'nın yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlara göre yüksektir. Bu farklılıklar, büyük olasılıkla çevresel koşullar, olgunluk aşaması, hasat ve hasat sonrası uygulamalar ile genotip özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Choo ve Sin 2012).

5.1.8. Element Analizi

Spesifik elementlerin biyolojik sistemlerde doğru ölçülmesi oldukça önemlidir. Bu elementler birkaç gruba ayrılabilir. Ana grup elektrolitler Na, K, Ca ve Mg olup, bunlar hücresel aktivite ve metabolizma gibi ana fizyolojik süreçler için gereklidir. İkinci gruptaki Fe, Mn, Zn, Co, Cu elementleri ve ametal olan Se, "eser elementler" olarak ifade edilirler. Bunlar metabolik ajan ve enzim katalizörü olarak rol alırlar, aynı zamanda biyolojik yapıların esansiyel bileşenleridir. Eser ağır metaller veya zehirli olanlar (Ag, Al, As, Pb, Cr, Cd, Hg, Ni, TI, Sr, Ba ve V), sağlıklı bir organizmada bulunmamalıdırlar. Bu elementler vücuda zararlı etki gösterirler (Fraga 2005).

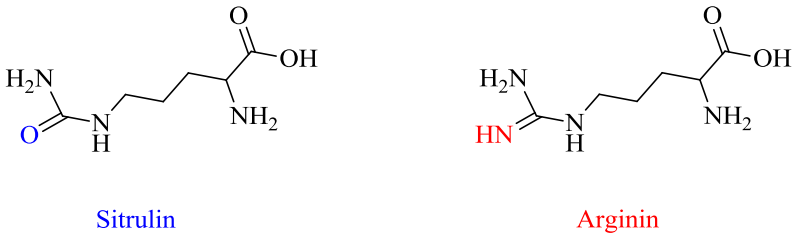
Metal olan Mn, Fe, Cu ve Zn ile metal olmayan Se insan vücudunda çok sınırlı oranda bulunmaları ve gerekliliklerinden dolayı eser elementler olarak bilinen mikro besinlerdir. Cu, Fe, Mn ve Se biyolojik aktiviteleri ortaklanmamış elektronları ile ilişkilidir. Bu elektronlar redoks reaksiyonlarına katılmalarını sağlamaktadır. Bu metaller biyolojik sistemlerde genellikle proteinlere bağlanıp metaloproteinleri oluşturur. Metaloproteinlerde bulunan metallerin birçoğu enzimatik sistemlerin parçasıdır. Bunlar, ya yapısal ve depolama fonksiyonu görür ya da proteini organizmadaki hedef bölgelerine taşınmak için kullanırlar. Mn, Fe, Cu, Zn ve Se insan sağlığını korumada rol alırlar. Bu eser elementlerden herhangi bir tanesinin yetersizliği istenmeyen patolojik durumlara öncülük edebilir, bu yetersizlik uygun destekle düzeltilebilir. Yeterince beslenen kişilerde eser element düzeyi biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirmek için gerekli miktarın üstüne çıkınca toksik etkiler oluşur (Fraga 2005).

Bu çalışmada, Dicle Üniversitesi'nde karpuz suyu ve liyofilizatın Ca, Se, Fe, Cu, Zn, Mn ve Pb analizleri ICP-OES cihazı, De Montfort Universitesi'nde ise liyofilizatın Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Se, Al, As, Pb, Cr, Cd, Ni, Sr, Ba, V ve U analizleri ICP-MS cihazı yapıldı. Element analizi sonuçlarının standart referans madde (ticari domates yaprağı) ile uyum içinde olduğu gözlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.1.10.1-4).

Karpuz suyu ve liyofilizatta Na, K, Ca, Mg elementlerinin oranı yüksek iken Al, As, Pb, Cr, Cd, Ni, Sr, Ba, V, U ağır metallerinin oranı oldukça düşük bulundu. Elde edilen bu verilerden; Diyarbakır karpuzunun antioksidan aktivitesinin yanında aynı zamanda vücut için gerekli olan eser elementlerce de zengin olduğunu görmekteyiz.

5.1.9. Bradford Metoduyla Protein Miktar Tayini

Karpuz, kuraklığa dayanmada önemli bir role sahip olan sitrulin amino asidi bakımından zengin doğal bir kaynaktır (Kawasaki ve ark. 2000). Sitrulin ilk olarak karpuz suyundan tanımlanmıştır, Rimando ve Perkins-Vezaie (2005). Sitrulin esansiyel bir amino asit değildir fakat, insanlar için esansiyel bir amino asit olan arginine metabolize olur. Arginin bütün bitkilerde mevcuttur ve memeli nitrik oksit (NO) sentezinde kullanılan azotlu bir substrat olup, kardiyovasküler ve immün fonksiyonlarda rol almaktadır. Sitrulin insanlarda nitrik oksit sistemini uyararak vazodilasyonun sağlanmasına yardımcı olur (Perkins-Veazie ve ark. 2015). Şekil 5.1.3'de sitrulin ve arginin amino asitlerinin molekül yapıları verilmektedir.



Şekil 5.1.3. Sitrulin ve arginin amino asitleri

Collins ve ark. (2007), karpuz suyu tüketiminin sağlıklı yetişkin aç bireylerde plazma arginin, ornitin ve sitrulin konsantrasyonunu yükseltip yükseltmediğine bakmışlar. İnsanlarda üç hafta düşük doz karpuz tüketiminden sonra açlık plazma arginin konsantrasyonunun %12 arttığı; 3 haftalık yüksek doz karpuz suyu tüketiminden sonra plazma arginin ve ornitin konsantrasyonunun sırasıyla %22 ve %18 arttığını gözlemişler. Açlık sitrulin konsantrasyonları kontrole göre artmamıştır fakat çalışma boyunca sabit kalmıştır. Arginin ve ornitinin yükselmiş açlık plazma konsantrasyonuna karşılık sitrulin konsantrasyonunun sabit kalması karpuz suyu tüketiminden kaynaklanan plazma sitrulininin etkili bir şekilde arginine dönüştüğünü göstermektedir. Plazma arginin konsantrasyonunun karpuz tüketimi ile alınan sitrulin ile arttırılabildiği rapor edilmektedir.

Karpuz suyu liyofilizatında bulunan protein miktarı standart bradford metodu ile 50-1500 µg/ml aralığında 13.532 ± 1.118 µg HSA/mg, mikro bradford metodu ile 1-15 µg/ml aralığında 10.573 ± 0.387 µg HSA/mg olarak ölçüldü ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.1.11).

5.1.10. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Karpuz suyu liyofilizatının BSA'nın oksidatif hasarı üzerine etkisi SDS-PAGE (%30 poliakrilamid/bisakrilamid) ile belirlendi. BSA hasarı Fenton reaksiyonu [$FeCl_2$ (1.0 mM), EDTA (1.0 mM) ve H_2O_2 (2.0 mM)] ile gerçekleştirildi. Liyofilizatın 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml ve 4.0 mg/ml konsantrasyondaki çözeltilerinin 2.0 mg/ml konsantrasyondaki BSA'yı hidroksil radikaline karşı koruma etkisi sırasıyla; %44.96 ± 1.22, %52.66 ± 0.65, %77.12 ± 0.30, %85.51 ± 0.01 ve %86.87 ± 0.12 olarak bulundu. BHT'nin 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml ve 4.0 mg/ml konsantrasyondaki çözeltilerinin 2.0 mg/ml konsantrasyondaki BSA'yı hidroksil

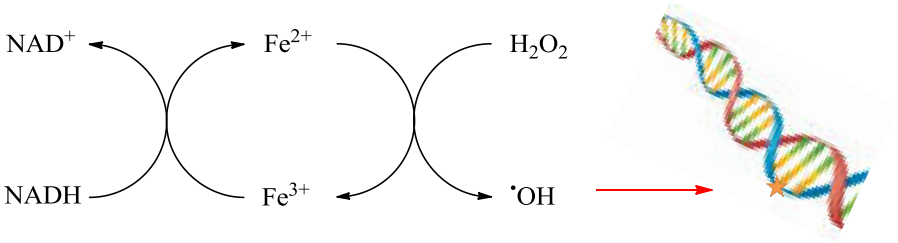
radikaline karşı koruma etkisi sırasıyla %88.71 ± 0.71, %89.63 ± 0.53, %96.58 ± 0.01, %97.74 ± 0.13 ve %98.70 ± 0.48 olarak bulundu (Şekil 4.1.12.1-2). Yaptığımız çalışmada, liyofilizatın artan konsantrasyonuna bağlı olarak BSA'yı hidroksil radikalinin proteinlerde meydana getirdiği oksidatif hasara karşı koruma etkisinin de yükseldiği tespit edildi.

Liyofilizatın 2 mg/ml ve 4 mg/ml konsantrasyonda gösterdiği koruma etkisi ile BHT'nin 0.2 mg/ml ve 0.4 mg/ml konsantrasyonda gösterdiği koruma etkisi arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi.

5.1.11. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Radikal kaynaklı DNA hasarı fosfat omurgası ve nükleotid bazlarında meydana gelir. Buralardaki hasar DNA hasarının sayısal bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. DNA omurgası negatif yüklü fosfat grupları ve elektronca zengin nükleotid bazlarından meydana gelir. Na^{+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{+}, Cu^{2+} gibi metal iyonları elektrostatik etkileşim yoluyla fosfat omurgasının yanında lokalize olur. Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları DNA nükleotid bazlarına kovalent bağlanır. Metal iyonları fosfat omurgasındaki oksijen atomlarının yükünü dengeleme veya bazlardaki azot atomlarının (özellikle guanin bölgelerinde) elektron çiftleri ile koordinasyon oluşturma yoluyla DNA'yı sabitler.

Oksidatif stres sonucu meydana gelen H_2O_2 ortamda bulunduğunda DNA'ya bağlı veya yanında lokalize halde bulunan Fe^{2+} ve Cu^{2+} gibi redoks aktif metal iyonlarının H_2O_2 ile tepkimeye girmesi sonucu hidroksil radikali oluşur. Hidroksil radikalinin deoksiriboz şeker omurgasından 40 hidrojen atomu koparması sonucu DNA radikal katılma ürünü oluşur, daha sonra fosfodiester omurgası yarılır ve DNA kesimi meydana gelir (Şekil 5.1.4). Buna ilaveten, hidroksil radikali 8-okso-guanin ve parçalanmış veya açılmış halka türevlerini oluşturarak nükleotid bazlarına hasar verebilir. DNA'da meydana gelen zincir kırıkları ve baz hasarı genetik mutasyonlar, kanser ve hücre ölümüyle sonuçlanabilir (Perron ve Brumaghim 2009).



Şekil 5.1.4. Fe^{3+}'ün NADH ile indirgenmesi, Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile tekrar yükseltgenmesi ve DNA hasarı oluşumu (Perron ve Brumaghim 2009)

Plazmid DNA kesimini incelemenin bir yolu süper sarmal DNA'nın (supercoiled DNA; kırık yok, Form I), gevşek sarmal (open circular DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) veya doğrusal (linear DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III) forma dönüşümünü incelemektir. Molekül ağırlıkları aynı olmasına karşın bu üç formun jeldeki göçleri farklıdır. Bu farklılık agaroz konsantrasyonuna, uygulanan akıma, tamponun iyonik kuvvetine ve DNA formunun yoğunluğuna bağlıdır. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için optimize olmuş koşullarda 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.

Hidrojen peroksidin UV ile etkileşmesi sonucu oluşan hidroksil radikalinin pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Kontrol DNA'nın supercoiled formunun (form I) yüzdesi (%) 100 olarak kabul edildi. H_2O_2 fotolizi sonucu DNA'nın %59.09'nun gevşek sarmal (form II) ve doğrusal (form III) forma dönüştüğü tespit edildi. Bu, aynı zamanda süper sarmal DNA'nın H_2O_2 fotolizi sonucu % inhibisyon değeridir. Yapılan bu çalışmada, liyofilizatın 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml ve 4.0 mg/ml derişimlerinde DNA'yı OH radikaline karşı koruma etkisinin değerleri sırasıyla; %43.31, %43.52, %61.73, %79.37 ve %84.40 olarak hesaplandı (Şekil 4.1.13). Sonuç olarak, liyofilizatın artan derişimine bağlı olarak plazmid DNA kesimini koruma etkisinin de yükseldiği belirlendi.

Karpuz suyu liyofilizatında bulunan likopen, fenolik ve flavonoidlerin hidroksil radikalinin oluşturduğu DNA hasarına karşı koruma sağladığını düşünmekteyiz.

Diyarbakır karpuz suyu ve liyofilizatının fenolik ve flavonoid içeriği açısından zengin olduğu tespit edildi. Polifenollerin antioksidan özelliklerinin moleküler temeli

için üç ana mekanizma kabul edilmektedir. Bunlar; polifenollerin serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girmesi ve serbest metallerin şelat oluşturmasından meydana gelen, sonucunda serbest radikal oluşan tepkimelerdir.

Karpuzda bulunan temel antioksidanlar olan polifenollerin hidrojen atomu transferi (HAT) (Tepkime 13) veya tek elektron transfer (TET) (Tepkime 14) mekanizmalarıyla serbest radikalleri inaktif hale getirdiğini düşünmekteyiz (Şekil 5.1.5). HAT mekanizmasında antioksidan (ArOH) serbest radikal ($R^{\bullet}$) ile reaksiyona girip O-H bağının homolitik kırılımı aracılığıyla radikale bir hidrojen atomu transfer eder:

$$ArOH + R^{\bullet} \longrightarrow ArO^{\bullet} + RH \qquad (13)$$

Yukarıdaki tepkimenin ürünleri zararsız RH türleri ve yükseltgenmiş ArO radikalidir. Bu reaksiyon, başka radikalin oluşumuna öncülük eder ancak, ArO radikali R radikaline göre daha az reaktiftir çünkü, bazı faktörler tarafından stabilize edilmiştir.

TET mekanizması ile R radikaline bir elektron transferi gerçekleşir:

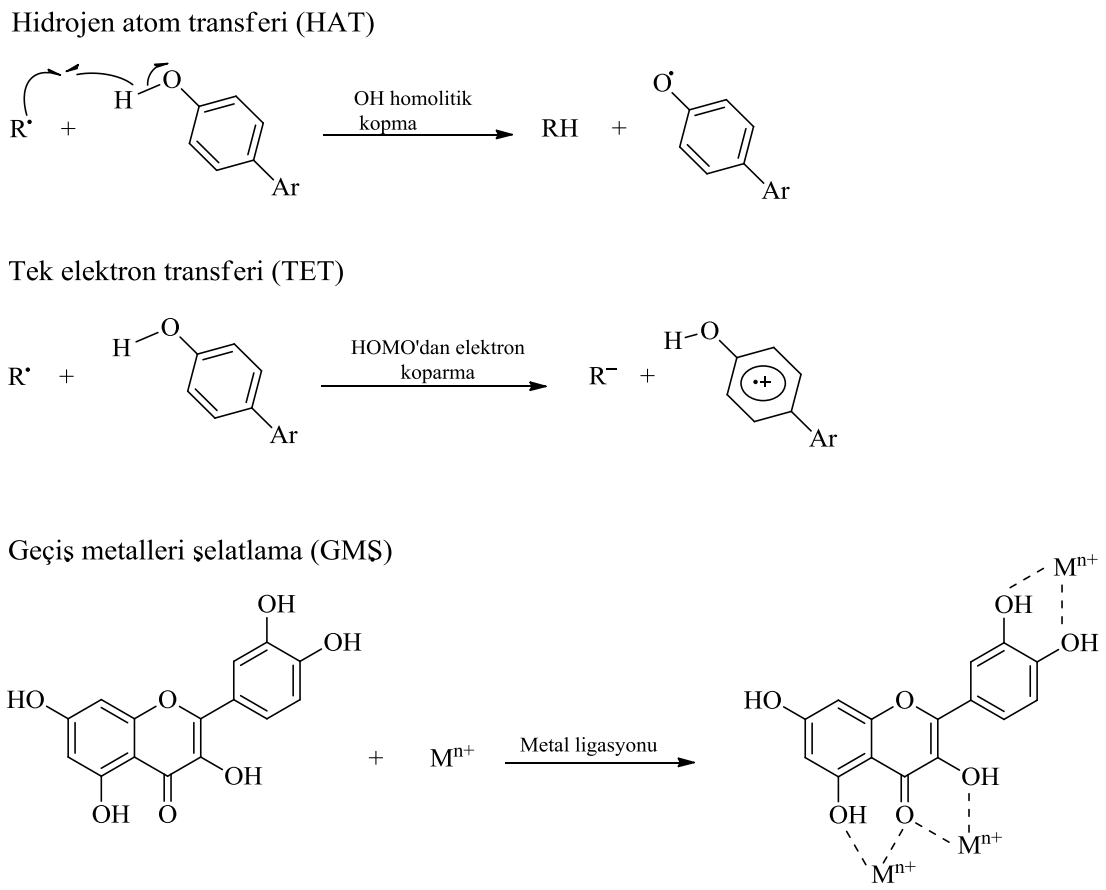
$$ArOH + R^{\bullet} \longrightarrow ArOH^{\bullet+} + R^{-} \qquad (14)$$

R^{-} anyonu çift elektrona sahip, enerjik olarak kararlı bir türdür. Bununla birlikte, ArOH katyon radikali daha az reaktif bir radikal türüdür.

Geçiş metal şelasyonu (GMŞ) (Tepkime 15) bir diğer antioksidan mekanizma olup, polifenolik bileşiklerin geçiş metal iyonlarını şelatlaması ile kararlı kompleks bileşikler meydana geldiğini düşünmekteyiz (Şekil 5.1.5). Bu kompleks bileşiklerin oluşmasıyla, serbest metaller yakalanır, bunların serbest radikal oluşturan reaksiyonlarda yer alması engellemektedir. Bazı metaller düşük oksidasyon basamaklarında (genelde Fe^{+2}) hidrojen peroksit ile beraber fenton tepkimelerinde rol almakta ve en tehlikeli reaktif oksijen türü olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır:

$$H_2O_2 + M^{n+} \longrightarrow HO^{-} + HO^{\bullet} + M^{(n+1)+} \qquad (15)$$

Hidroksil radikali genellikle en reaktif radikallerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu radikal çok kısa yarılanma ömrü (yaklaşık 10^{-9} saniye) ve çok yüksek reaktiviteye sahiptir. Hidroperoksitler süperoksit dismutaz tarafından metabolize edilmelerine rağmen hidroksil radikalleri enzimatik tepkimelerle elimine edilemezler. Bundan dolayı, hidroksil radikalleri karşılaştığı her çeşit substratla etkileşmektedir.



Şekil 5.1.5. Antioksidan aktivite mekanizmaları (Leopoldini ve ark. 2011)

5.2. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Meyve ve sebze bakımından zengin diyetler azalmış kanser ve koroner kalp hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir. Diyette bulunan biyoaktif bileşiklerin bu etkilerden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Likopen farklı kanser çeşitleri üzerinde potansiyel antikanser aktivite gösteren bir karotenoittir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda likopen içeren gıdaların tüketimi ile prostat, kolon ve akciğer kanseri gibi kanser çeşitlerinin gelişme riski arasında ters oran olduğu rapor edilmektedir (Gloria ve ark. 2014). Likopen apoptozu tetikleyerek meme, kolon ve prostat kanser hücre hatları üzerinde kanser öneyici etki göstermektedir (Diehl 2003).

Karpuz suyu liyofilizatının MCF-7, HepG2 ve BeWo hücre hatları üzerindeki etkisi MTT deneyi ile araştırıldı. MCF-7 (5 x 10^3 hücre/ml), HepG2 (15 x 10^3 hücre/ml) ve BeWo (20 x 10^3 hücre/ml) hücre hatlarının her birinden 0.1 ml alınıp 96 kuyucuklu tabakanın farklı kuyucuklarına bırakıldıktan sonra 37 ^oC ve %5 CO_2/ %95 hava ile %100 nemlendirilmiş ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bütün hücre hatlarının hazırlanan standart *in vitro* kültür koşullarında normal büyüme özelliklerine sahip olduğu gözlemlendi. Bu işlemden sonra MTT boyası ile muamele edilen hücre hatlarında liyofilizatın hücre büyümesine olan etkisi % hücre canlılığı olarak tespit edildi. Liyofilizat uygulanmayan hücreler %100 canlı olarak kabul edildi ve bundan yola çıkarak % inhibisyon oranları hesaplandı.

Liyofilizatın 1 mg/ml konsantrasyonda MCF-7 hücrelerini %80.024 ± 3.34 oranında, 7.5 mg/ml konsantrasyonda HepG2 hücrelerini %90.386 ± 2.40 oranında ve 5 mg/ml konsantrasyonda BeWo hücrelerini %58.711 ± 1.85 oranında inhibe ettiği tespit edildi ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.2.1.1-2, Şekil 4.2.1.1-2). Bu çalışmada kullanılan MCF-7 meme kanser hücre hattı östrojen receptörü açısından pozitiftir.

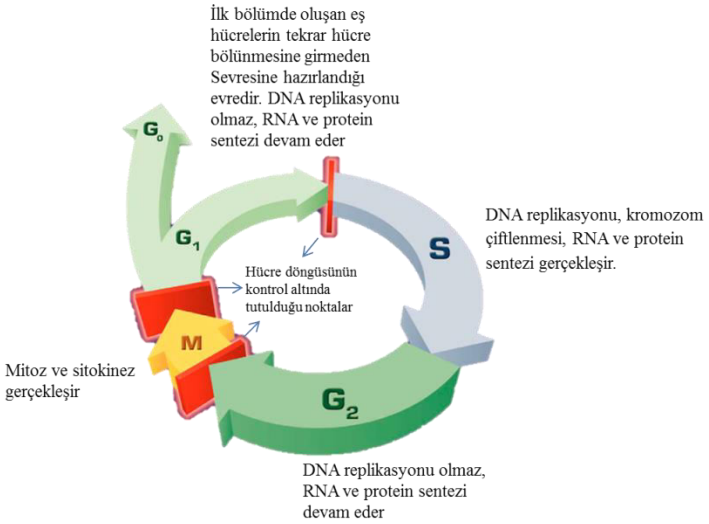
Teodoro ve ark. (2012) bazı insan kanser hücre hatlarını (prostat DU145, kolon adenokarsinoma HT-29, kolon T-84, serviks Hela, meme MCF-7, karaciğer HepG2 ve larenks Hep-2) 50 ^oC'deki suda 1 µM, 3 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda hazırlanan likopen çözeltisi ile 24, 48 ve 96 saat boyunca muamele ettikten sonra hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptotik hücreleri araştırmışlardır. Likopenin bütün hücre hatlarında hücre içine geçtiği ve en yüksek hücre içi konsantrasyona HT-29 ve T-84 hücrelerinde

ulaştığı tespit edilmiştir. Kontrole göre 48 saat sonunda hücre canlılığı TH-29 ve T-84'de %30, MCF-7'de %10, 96 saat sonunda ise MCF-7'de %25 ve HepG2'de %30 oranında anlamlı olarak düştüğü kaydedilmiştir. Yapılan bu çalışmada ayrıca, likopen (3 ve 5 μM) ile 48 saat muamele sonunda MCF-7 hücrelerinin G0/G1 evresindeki tutuklaması, G0/G1'deki hücrelerin birikimi ve G2/M evresinde önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin likopenle 48 saat muamelesi sonunda, G0/G1 fazında hücreler artmış ve G2/M fazında hücreler azalmıştır. HepG2 hücrelerinin uygulanan bütün likopen konsantrasyonlarında 48 saat sonunda G2/M fazında tutulmaları artmış G0/G1 fazında ise azalmıştır. Bununla birlikte, likopenin (3 ve 5 μM) S fazında da hücre canlılık oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. Tomurcuklanma (çoğalma) ve apoptoz arasındaki denge değişimi kanserle ilişkilidir. MCF-7 hücrelerinin 96 saat 3 μM likopen ile muamele edilmesinin kontrole göre apoptozu 2 kat arttırdığı bildirilmektedir. HepG2 hücrelerinin bu durumdan etkilenmediği rapor edilmiştir.

Gloria ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışmada, likopenin MCF-7 hücre hattının canlığının inhibe ettiği ve apoptozu yükselttiği, bunun aksine meme normal epitel hücresi olan MCF-10 üzerinde etki göstermediği rapor edilmektedir. Likopenin meme kanser hücreleri üzerine etki mekanizmasının hücre tipine ve uygulama zamanına bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir. Uptala ve ark. (2013) da likopenin MCF-7 meme kanser hücre hatları ve MCF-10 meme normal epitel hücre hatları ile çalışmaları neticesinde benzer sonuç elde etmişlerdir. Likopenin sadece hedef bir onkogen varlığında antikanser etki gösterdiği bildirilmektedir.

Meme (Karas ve ark. 2000, Prakash ve ark. 2001) ve prostastat kanser hücreleri (Mossine ve ark. 2008, Ford ve ark. 2011, Yang ve ark. 2011) ile ilgili yapılan birçok çalışmada likopenin hücre çoğalmasını durdurma ve/veya apoptozu indükleme yolu ile bir antitumor ajan gibi davrandığı rapor edilmektedir (Teodoro ve ark. 2012).

Hücre döngüsünde hız sınırlayıcı bir basamak olan G1 fazı aracılığıyla hücrelerin devamlılığı kanserde sık sık bozulmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, likopenin G1 fazında hücre döngü tutuklamasını indükleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca, likopenin G0/G1 tutuklamasını ve S fazını durdurmayı indüklediği bulunmuştur. Şekil 5.2.1'de hücre döngüsü aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 5.2.1. Hücre döngüsü dört aşamada gerçekleşir

5.3. Toksisite Testi

Mikrotoks su, hava, toprak, tortu gibi farklı yüzeylerdeki toksik maddeleri tespit etmek için biyolüminesans bir bakteri olan *V. fischeri* kullanan *in vitro* test sistemidir. *V. fischeri* patojen olmayan deniz bakterisidir, metabolizma doğal parçası olarak lüminesans yayar. Bu bakteri toksik maddelerin geneline karşı hassastır, toksik bir maddeye maruz kaldığında toksisiteye tepki olarak lüminesansı azalır. Bu durum, hücresel solunumun bir yan ürünüdür, doğrudan toksisite ile ilişkilendirilir ve *V. fischeri* bakterisi için % inhibisyon olarak hesaplanır (Atkinson 2015, Modern Water 2015).

Karpuz suyu liyofilizatına maruz bırakılmış *V. fisheri* bakterisinin parlaklığı mikrotoks temel test yöntemi kullanılarak ölçüldü. Mikrotoks temel testi numunenin akut toksisitesini ölçen bir yöntemdir. Karpuz suyu liyofilizatının 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lık çözeltilerinin 5. ve 15. dk'larda *V. fisheri* bakterisi üzerine % inhibisyon etkisi tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar sırasıyla 125 µg/ml'nin; 5. dk toksik etkisi %81.09 ± 3.40 15. dk ise %6.96 ± 3.90, 250 µg/ml'nin; 5. dk toksik etkisi %14.60 ± 2.89 15. dk ise %7.45 ± 5.20, 500 µg/ml'nin; 5. dk toksik etkisi %25.09 ± 2.10 15. dk ise %18.81 ± 1.98, 1000 µg/ml'nin; 5. dk toksik etkisi %16.63 ± 1.09 15. dk ise %9.55 ± 4.12 olarak ölçüldü ($p \leq 0.05$) (Tablo 4.3.1-2, Şekil 4.3.1-2).

Liyofilizat konsantrasyonu ve zaman arttıkça % *V. fischeri* inhibisyon değerinin azaldığı tespit edildi.

5.4. *İn Vivo* Metotlar

5.4.1. Vücut Ağırlık Takibi

Ortalama vücut ağırlıkları 265 g olan erkek wistar albino sıçanlar her grupta 10 tane olacak şekilde rastgele 9 gruba bölündü (1. Grup: kontrol, 2. Grup: NaCl+şeker, 3. Grup: karpuz suyu, 4. Grup: liyofilizat, 5. Grup: ticari likopen, 6. Grup: $NaAsO_2$, 7. Grup: $NaAsO_2$+karpuz suyu, 8. Grup: $NaAsO_2$+liyofilizat, 9. Grup: $NaAsO_2$+ticari likopen). Karpuz suyu ve liyofilizat içinde bulunan toplam şeker miktarı önceki deneylerimizde hesaplanmıştı. Elde edilen bu veriler ve $NaAsO_2$ içinde bulunan Na miktarları ışığında NaCl+şeker (2. grup) kontrol grubu oluşturuldu. Buradaki amacımız; karpuz suyu veya liyofilizat $NaAsO_2$ ile uygulandığında bu iki grupta şeker ve sodyumdan kaynaklanan etkiyi tespit etmektir. Bunlara ilaveten, deneysel çalışmalarımız kapsamında karpuz suyu ve liyofilizatta bulunan likopen miktarı da hesaplandı. Bu sonuçlardan yola çıkarak da ticari likopen grubunun dozu ayarlandı. Ayrıca, ticari likopen çözeltisini saf zeytin yağında hazırladığımızdan bunun da etkisini incelemek için 2. grubun diyeti (NaCl+şeker) saf zeytin yağı ile hazırlandı. Karpuz suyu ve liyofilizat her gün, $NaAsO_2$ ise ilk iki hafta (14 gün) günaşırı uygulandı ancak, arsenikli bazı gruplarda sıçan kaybı yaşanınca $NaAsO_2$ üç günde bir verilmeye başlandı. Bütün uygulamalar mide içi sondası kullanılarak yapıldı. İki hafta sonunda bütün gruplardan dörder sıçan, dördüncü hafta sonunda ise geriye kalan altı sıçan eter anestezisi kullanılarak sakrifiye edildi.

Vücut ağırlığındaki azalma genel sağlık durumunun bozulması için önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Arseniğin biyokimyasal bozukluklar ve toksikolojik etkilere sebep olması, sağlık üzerine ciddi bir tehlike olarak rapor edilmektir (Yousef ve ark. 2008, Yadav ve ark. 2009, Messarah ve ark. 2012, Messarah ve ark. 2013). Bu çalışmada elde edilen bulgular şöyledir, ilk 14 gün süreyle gün aşırı $NaAsO_2$'e maruz bırakılmış sıçanlarda vücut ağırlığının deney başlangıcına göre önemli oranda azaldığı tespit edildi. Arsenikle beraber karpuz suyunun verildiği grupta kilo azalması %11.20 iken sadece arsenik verilen grupta %18.38 oranında kaydedildi. Bundan farklı olarak, ticari likopen verilen sıçan grubunda vücut ağırlığında önemli değişiklik olmamıştır. Diğer taraftan, $NaAsO_2$+ticari likopen'e maruz bırakılmış sıçan grubunun vücut ağırlığı %6.42 oranında artmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler ışığında, iki hafta sonunda kontrol,

karpuz suyu, liyofilizat ve ticari likopen gruplarında kilo artışı olduğu veya vücut ağırlığının sabit kaldığı ve sıçanların genel sağlıklarında bozulma olmadığı gözlenmiştir. Ancak, arseniğe maruz bırakılmış sıçanların genel sağlık durumunda bozulma olduğu, karpuz suyu ve ticari likopenin bu durumu iyileştirme yönünde pozitif etki gösterdiği tespit edildi. Dört hafta (28 gün) sonunda $NaAsO_2$+liyofilizat grubu (%3.5 azalma) dışında diğer bütün gruplarda başlangıca göre kilo artışı kaydedildi. $NaAsO_2$ verilmeyen sıçanlardaki kilo artış oranı %14.62-%18.02 (kontrol grubu %14.62 oranında kilo artışı) iken, $NaAsO_2$ grubu %4.78, $NaAsO_2$+ticari likopen grubu %1.42 ve $NaAsO_2$+karpuz suyu grubunda %15.35 oranında kilo artışı ölçüldü. Bu sonuçlara göre, arsenik verilmeyen sıçanların 28 gün sonunda genel sağlık durumunda bozulma olmadığı, $NaAsO_2$'ın sıçanların kilo almalarını ve büyümelerini olumsuz yönde etkilediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.4.1, Tablo 4.4.5.1-2).

Ayrıca bu süre sonunda, karpuz suyu verilen hayvanlar başlangıca göre %14.62 ve $NaAsO_2$+karpuz suyu grubu ise %15.35 oranında kilo almıştır. Bu sonuçtan, karpuz suyunun arsenik ile oluşturulan toksisite üzerine koruyucu ve iyileştirici etkisi olduğu çıkarılabilir. Karpuz suyu (1 ml/ sıçan) ve liyofilizatın (100 mg/ kg) bu deney kapsamında uygulanan dozlarının içerdikleri biyoaktif bileşik (fenolik, flavonoid gibi) oranları farklıdır. Bundan dolayı, karpuz suyu ve liyofilizatın arsenik ile oluşturulan toksisite üzerine koruyucu ve iyileştirici etkileri farklı ölçülmüştür. Arsenik uygulanan sıçanların vücut ağırlıklarında kontrol gruplarına göre azalma gözlendi, bu durum doku proteinlerinin aşırı yıkımı ile açıklanabilir (Chatterjea ve Shinde 2002, Messarah ve ark. 2013).

Yapılan bu çalışmaya benzer olarak; Messarah ve ark. (2013) yeşil çay yaprağı su özütünün $NaAsO_2$ ile oluşturulmuş toksisite üzerine etkisini incelemişler, deney sonunda kontrol grubunda %10.77 (291.15+22.11 g/ 301.35+20.5 g) oranında kilo artışı, $NaAsO_2$ grubunda ise %8.79 (285.32+25.4 g/ 260.22+21.35 g) oranında kilo azalması tespit edilmiştir. Acharyya ve ark. (2015) ise, 28 gün sonra kontrol grubu vücut ağırlığında %16.78 ve $NaAsO_2$ verilen deney grubunda %10.53 oranında artış kaydetmişlerdir. Poduri ve ark. (2013) ise, sekiz hafta *C. lanatus* sentinel özütü ile beslenen farelerde kontrol grubuna göre daha az kilo artışı, 12 hafta sonunda yağsız vücut kütlesinde önemli düşüş kaydetmişlerdir.

Hong ve ark. (2015) ticari olarak temin ettikleri karpuz tozunun erkek Sprague-Dawley sıçanlarının vücut ağırlıkları üzerinde önemli değişiklik oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Diğer taraftan farklı bir çalışmada, kontrol grubunun vücut ağırlığında %0.86 ve As_2O_3 grubunda %0.87 oranında artış ölçülmüştür (Mondal ve ark. 2013).

Yaptığımız bu çalışmada da benzer olarak, deney sonunda kontrol grubu (303.75 ± 6.18 g/sıçan) ve karpuz suyu grubunun (303.00 ± 22.17 g/sıçan) vücut ağırlıkları arasında fark ölçülmedi. Bu verilere bakılarak, 28 gün boyunca karpuz suyu tüketimi kilo aldırmamaktadır sonucuna varılabilir.

Bunlara ilaveten, elde ettiğimiz bu sonuç; Yousef ve ark. (2008), El-Demerdash ve ark. (2009), Poduri ve ark. (2013), Acharyya ve ark. (2015) ile Hong ve ark. (2015)'nın elde ettikleri sonuçlar ile uyum içindedir.

5.4.2. Biyokimyasal Analizler

Kan örnekleri silikonlu tüplere alınıp aynı gün 2500 rpm'de 30 dk santrifüj (+4 ^{o}C) edildi. Ayrılan serumlarda kan şekeri (glukoz), trigliserid (trig), kolesterol (chol) (Tablo 4.4.2.1), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin ve albumin değerleri tayin edildi (Tablo 4.4.2.2).

Arsenik kaynaklı ROT ve sonrasında gelişen hücresel antioksidan korumada azalma memeli dokularındaki pro-oksidan/antioksidan dengenin bozulması ile sonuçlanır (Valko ve ark. 2006). Ayala-Fierro ve ark. (1999)'nın yaptıkları *in vitro* çalışmada, arseniğin farklı oksidasyon basamakları arasındaki dönüşümler sırasında ROT üretildiği ve organ zehirlenmelerine sebep olduğu bildirilmektedir. ROT hücresel biyomoleküllerle doğrudan etkileşir, lipid, protein ve DNA hasarı oluşturur, hücre ölümüne öncülük eder (Halliwell ve Gutteridge 2002). Arsenik sülfhidril grubuna bağlanma kapasitesine bağlı olarak, özellikle hücresel glukoz alınımı, glukoneogenez, yağ asidi oksidasyonu ve glutatyon üretimine katılan birçok enzimin aktivitesini inhibe edebilir (Pal ve Chatterjee 2004).

Stres etkenlerinin sıçanların karbohidrat metabolizması üzerinde etkisi glukoz, glikojen ve laktik asit düzeyinin değişmesiyle kendini gösterir. Bunlar arasından kan glukoz seviyesi çevresel stresin bir belirleyicisi olarak karbohidrat metabolizmasındaki değişikliği yansıtır (Messarah ve ark. 2013). Arsenik veya metillenmiş arsenik

metabolitlerine uzun süre maruziyet sonucu sıçanlarda Diyabetis Melitusun tetiklendiği ve bu durumun hiperglisemiye neden olabileceği rapor edilmektedir (Tseng 2004). Gerçekleştirdiğimiz mevcut çalışmada, iki hafta sonunda $NaAsO_2$ grubunun glukoz değeri kontrol grubuna göre %13.32 oranında daha düşük, karpuz suyunun ise %5.91 oranında daha yüksek ölçüldü. Genel olarak kan glukoz seviyesinin düştüğü tespit edildi. Dört haftalık süre (28 gün) sonunda kan glukoz değeri kontrol grubuna en yakın olan karpuz suyu (%3.74 oranında artış) grubu olduğu belirlendi. Bunun tersine, $NaAsO_2$ grubunda %5.52 oranında düştüğü tespit edildi. Ayrıca, $NaAsO_2$ grubu dışındaki bütün sıçanların kan glukoz seviyelerinin yükseldiği gözlemlendi (Tablo 4.4.2.1).

Deneysel çalışmamızın her iki periyodunda da karpuz suyu, ticari likopen ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarında glukoz seviyesinin kontrol grubuna göre yükselmesi ile $NaAsO_2$ grubunda düşmesi uyum içindedir. Messarah ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmada arsenik uygulanan sıçanlarda bizim çalışmamızın tersi olarak; kan glukoz seviyesinin kontrol grubuna göre %15 oranında yükseldiğini rapor etmektedirler.

Kan glukoz seviyesinin yükselmiş olması; karbohidrat metabolizmasının bozulduğu, adenokortikotropik hormon ve glukagon hormon düzeyinin arttığı ve/veya insülin aktivitesinin düşmesi ile karaciğer glikojen salınımının arttığı ifade edilebilir (Lia ve ark. 1994, Walton ve ark. 2004, Paul ve ark. 2007).

Mevcut çalışmamızda, iki hafta (14 gün) sonunda liyofilizat grubu (%19.81 oranında azalma) diğer bütün grupların kan serumundaki trigliserid oranın kontrol grubuna göre oldukça yükseldiği tespit edildi. 28 günlük uygulama sonunda ise, bütün gruplarda trigliserid seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük ölçüldü (Tablo 4.4.2.1). Dört haftalık uygulama sonrasında, bizim yaptığımız çalışmaya benzer olarak, Hong ve ark. (2015) ticari karpuz tozunun erkek Sprague-Dawley sıçanlarının trigliserid değerini düşürdüğünü kaydetmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, iki hafta sonunda karpuz suyu verilen sıçanların serum kolesterol değeri kontrol grubununkine eşit ölçüldü. $NaAsO_2$ verilen grupta %75.65 oranında, $NaAsO_2$+ticari likopen verilen grupta %92.30 oranında yükselme olduğu tespit edildi. 28 gün sonra ise karpuz suyu grubunun serum kolesterol seviyesini %14.29, $NaAsO_2$ grubunun %9.09, $NaAsO_2$+ticari likopen grubunun ise %22.08

oranında düşürdüğü; geri kalan diğer grupların kan kolesterol seviyesinin kontrol grubuna göre yükseldiği tespit edildi (tablo 4.4.2.1). Diğer taraftan, *C. lanatus* sentinel özütü verilen farelerde serum kolesterol konsantrasyonunun düştüğü tespit edilmiştir (Poduri ve ark. 2013).

Messarah ve ark. (2013)'nın çalışmasında arsenik uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre toplam kolesterol değeri %14 oranında yükselmiştir. Yeşil çay özütü deneklere verilince bu değerlerde iyileşme kaydedilmiştir.

Alaninaminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), bilirubin ve albumin karaciğer hastalıklarının tanısında kullanılan laboratuvar bulguları olup, genel anlamda karaciğer hastalığının varlığını araştıran testlerdir. Bunlar karaciğer fonksiyon testleri olarak da ifade edilirler. Bu laboratuvar bulgularının bir kısmı karaciğerdeki yapısal değişiklikleri, bir kısmı biliyer sisteme (safranın oluştuğu, yoğunlaştığı ve karaciğerden on iki parmak bağırsağına taşındığı organlar ve kanallar) ilişkin patolojileri bazıları ise karaciğerin sentez kapasitesini göstermekte olup bu yönüyle bir karaciğer hastalığının varlığını, niteliğini ve bir ölçüde de ağırlığını yansıtan testlerdir (Sonsuz 2007).

Bu testlerden ALT ve AST hepatoselüler hasarı, bilirubin ise hem hepatoselüler hasarı hem de kolestazı göstermekte öncelikli olup, her iki nedenle de artabilir. Albumin düzeyi ise karaciğerin sentez kapasitesini yansıtan testlerdendir. Karaciğer hastalıklarının birçoğunda bu parametrelerin birlikte bozulmuş olduğu görülür (Sonsuz 2007).

Alaninaminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) vücutta birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunan hücre içi enzimlerdir. ALT öncelikle karaciğer ve böbreklerde bulunup, kalp ve iskelet kasında daha az miktarda mevcut iken, AST daha çok kalp kası, karaciğer ve iskelet kaslarında bulunur. ALT hücre stoplazmasında bulunurken AST hem stoplazmada hem de mitokondiride bulunur. Serum enzimi olan AST ve ALT seviyesinin yükselmesi hepatositlerde geçirgenlik ile nekroz ve/veya hasarın arttığının göstergesidir (Altaş ve ark. 2011, Sonsuz 2007).

Arsenik toksisitesinde hedef organ karaciğerdir. AST ve ALT gibi hepatik enzimlerde sızıntı hepatoselüler hasarın indirek biyokimyasal göstergesi olarak kullanılmaktadır. Yaptığımız çalışmada elde edilen mevcut sonuçlar şöyledir; iki hafta

sonunda $NaAsO_2$ (%65.68 oranında), $NaAsO_2$+liyofilizat (%85.21 oranında) ve $NaAsO_2$+ticari likopen (%86.40 oranında) gruplarının AST değeri kontrol grubunun AST değerine göre oldukça yüksektir. Diğer taraftan, $NaAsO_2$+karpuz suyu grubunun değeri ise kontrol grubuna göre %36.09 oranında düşük çıkmıştır. ALT sonuçlarına baktığımızda ise; 14 gün sonunda ALT değeri yüksek çıkan gruplar; $NaAsO_2$ (%32.87 oranında), $NaAsO_2$+liyofilizat (%41.83 oranında) ve $NaAsO_2$+ticari likopen (%59.74 oranında)'dir. $NaAsO_2$+karpuz suyu grubu ALT değerini %32.83 oranında düşürmüştür. 28 gün sonunda farklı olarak; sadece $NaAsO_2$ grubunun hem AST (%47.44 oranında) hem de ALT (%41.04 oranında) değeri kontrol ve diğer bütün gruplara göre yüksek çıkmıştır (Tablo 4.4.2.2). Elde ettiğimiz bu verilerden; 14 gün ve 28 gün arsenik uygulaması sonucu sıçanlarda kontrol grubuna göre karaciğer hasarı oluştuğu, karpuz suyunun ve liyofilizatın oluşan bu hasara karşı koruma sağladığı tespit edildi. Buna ilaveten 14 gün sonunda ticari likopenin koruma etkisinin olmadığı, diğer taraftan 28 gün sonunda ticari likopenin karpuz suyundan daha yüksek oranda koruma sağladığı gözlendi. Bu parametrelerde sonuç olarak; 28 gün sonunda karpuz suyu, liyofilizat ve ticari likopenin AST ve ALT değerleri üzerinde koruma etkisi gösterdiği ifade edilebilir.

Yaptığımız bir başka çalışmada; 28 gün boyunca sıçanlara karbon tetraklorür (CCl_4) verilip, oluşan karaciğer hasarına karşı Diyarbakır karpuz suyunun etkisi incelendi. Karbontetraklorürün serum AST ve ALT düzeyini kontrol grubuna göre oldukça yükselttiğini, karpuz suyu+karbon tetraklorür uygulamasının ise AST ve ALT seviyesini pozitif kontrol olarak kullanılan ursodeoksikolik asit seviyesine indirdiğini tespit ettik. Karpuzda bulunan likopenin AST ve ALT aktivitesini düşürmeden sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Altaş ve ark. 2011).

Messarah ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada arsenik uygulanan sıçanlarda AST ve ALT değerlerinin kontrol grubuna göre %25 ve %31 oranında düştüğünü ancak, yeşil çay uygulamasının tek başına bu değerleri düzeltemediği, yeşil çay özütü ve $NaAsO_2$ birlikte uygulanınca düzelme kaydedildiğini rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, Hong ve ark. (2015) ticari karpuz tozunun erkek Sprague-Dawley sıçanlarının AST ve ALT değerlerini etkilemediğini kaydetmişlerdir.

Yapılan hayvan deneyi çalışmasında, 14 gün sonra $NaAsO_2$+karpuz suyu (%0.71 oranında azalma) verilen sıçan grubu dışındaki diğer bütün gruplarda kontrol grubuna

göre serum albumin değerinde önemli oranda azalma veya artma kaydedildi. Bu grupları karşılaştırdığımızda, karpuz suyu ve liyofilizat grubunun albumin değeri %15 oranı ile en az düşerken, $NaAsO_2$+ticari likopen grubunun albumin değeri %82.14 oranı ile en çok artandır. Ayrıca, 28 gün sonunda kontrol grubu ile karşılaştırınca serum albumin değeri en çok düşen $NaAsO_2$ grubudur (%20.39 oranında azalma). Sonuç olarak, 28 günlük uygulama sonunda karpuz suyu ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının albumin değerinin (%3.88 azalma oranı) aynı olduğu tespit edildi (Tablo 4.4.2.2).

Yaptığımız deneysel çalışmaya benzer şekilde, arsenik uygulanan sıçanlarda toplam protein ve albumin değerlerinin %14 ve %18 oranında düştüğü rapor edilmiştir. Arsenik uygulanan sıçanlarda protein konsantrasyonlarının düşmesi protein sentezi ve/veya metabolizmasında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanabilmektedir (Messarah ve ark. 2013).

Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturduğumuz önceki çalışmamızda da, CCl_4 uygulanan grubun serum albumin seviyesi yükselmiş, Diyarbakır karpuz suyu+CCl_4 verilen sıçanların serum albumin seviyesi düşmüştür (Altaş ve ark. 2011).

Kanda yükselmiş bilirubin seviyesi karaciğerde hasar meydana geldiğini ifade etmektedir. Bundan dolayı, bilirubin seviyesi nekrozis şiddetini belirleyen en önemli klinik belirteçtir. Kandaki bilirubinin artması hepatositlerin bağlama, konjugasyon ve salgılama kapasitelerinin de bir ölçüsüdür. Messarah ve ark. (2013) arsenik uygulanan sıçanlarda toplam bilirubin seviyesinin %34 oranında yükseldiğini tespit etmişlerdir. Yapılan bu deneysel çalışmada; iki hafta sonunda $NaAsO_2$ ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarındaki sıçanların kan serumunda toplam bilirubin seviyesinin önemli oranda yükseldiği tespit edildi. Dört hafta sonunda ise karpuz suyu ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının bilirubin değerlerinin %50 oranında düştüğü, $NaAsO_2$ grubunun bilirubin seviyesinde önemli oranda artma olduğu tespit edildi (Tablo 4.4.2.2). Bu çalışmada, kan bilirubin seviyesinin bu şekilde çıkması sakrifikasyon sırasında uygulama kaynaklı hatadan da olabilmektedir (Giniş ve Onat 2010). Karbontetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturduğumuz önceki çalışmamızda ise, CCl_4 uygulanan grubun serum bilirubin seviyesi yükselmiş, Diyarbakır karpuz suyu+CCl_4 verilen sıçanların serum bilirubin seviyesi düşmüştür (Altaş ve ark. 2011).

5.4.3. Protein Miktar Tayini

Sıçan karaciğer doku homojenatındaki protein miktarı 14 gün ve 28 gün sonunda tayin edildi. 14 gün sonra kontrol grubunun (1. grup) protein miktarı 2.99 ± 0.24 mg/ml olarak tespit edilirken, karpuz suyu (3. grup), liyofilizat (4. grup), ticari likopen (5. grup) ve $NaAsO_2$ (6. grup) gruplarının protein miktarları sırasıyla; 2.19 ± 0.44, 2.23 ± 0.46, 2.21 ± 0.36 ve 1.84 ± 0.39 mg/ml olarak ölçüldü. Protein miktarının bütün gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, 7. grup ($NaAsO_2$+karpuz suyu) ve 8. grupta ($NaAsO_2$+liyofilizat) daha çok azaldığı ancak, bu veriler arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar olmadığı tespit edildi (Tablo 4.4.5.1, Şekil 4.4.3).

Dört hafta sonunda sıçan karaciğer dokusunda kontrol grubunun (1. Grup) protein miktarı 3.20 ± 0.48 mg/ml iken; karpuz suyu (3. Grup), liyofilizat (4. Grup), ticari likopen (5. Grup) ve $NaAsO_2$ (6. Grup) gruplarının protein miktarları sırasıyla; 2.83 ± 0.05, 1.97 ± 0.12, 2.17 ± 0.24 ve 1.90 ± 0.05 mg/ml olarak ölçüldü. Karpuz suyu ve liyofilizatın arsenik verilen gruplarda protein miktarını yükselttiği tespit edildi. Ancak, değerler arasında istatistiksel anlamda farklılık mevcut olmadığı tespit edildi (Tablo 4.4.5.2, Şekil 4.4.3).

5.4.4. Protein Karbonil Miktar Tayini

Arsenik toksisitesi pro-oksidan ve antioksidan dengesinin bozulması ile arseniğin fonksiyonel proteinlerin tiyol grubuna olan yüksek ilgisine bağlı olarak gelişmektedir. Serbest radikaller aynı zamanda DNA, protein ve lipidlerde hasar meydana getirirler. Nitekim, DNA ve proteinlerde meydana gelen hasarlar; lipitlerde *in vivo* oksidatif stres durumlarında oluşan hasardan çoğu zaman daha önemli olabilmektedir (Reznick ve Packer 1994). Proteinlerin *in vivo* oksidatif modifikasyonları; reseptörler, sinyal iletim mekanizmaları, taşıma sistemleri ve enzimler gibi proteinleri kapsayan çeşitli hücresel fonksiyonları etkilemektedir (Samuel ve ark. 2005).

Proteinlerdeki oksidatif hasar; protein karbonil (PCO) düzeyinin yükselmesi ve protein tiyol (PSH) seviyesinin düşmesi ile kendini gösterir (Dubey ve ark. 1996, Butterfield ve ark. 1998). Serbest oksijen radikallerinin protein kalıntılarının lizin, arjinin, prolin, treonin ve glutamik asit yan zincirleri ile tepkimesi sonucu karbonil

türevleri oluşur (Stadtman ve Berlett 1997). Bundan başka, lipid peroksidasyonu sırasında üretilen malondialdehid veya 4-hidroksi-2-nonenal gibi aldehitler lizinin ε-amino grubu veya sisteinin sülfhidril kalıntılarına saldırır karbonil türevleri oluşur (Uchida ve Stadtman 1993). Bunlara ilaveten, glikasyon ve glikoksidasyon reaksiyonları ile de proteinlerde karbonil grupları oluşmaktadır. Bundan dolayı, protein karbonil grupları serbest radikallerin neden olduğu protein oksidasyonu için önemli markırdır (Samuel ve ark. 2005).

Arsenik uygulaması sonucu sıçan karaciğer dokusunda oluşan protein karbonil miktarı 14 gün ve 28 gün sonra ölçüldü. 14 gün sonra gruplarda ölçülen protein karbonil değerleri; kontrol 18.95 ± 4.50 nmol/mg, karpuz suyu 14.87 ± 2.39 nmol/mg, liyofilizat 15.30 ± 1.34 nmol/mg ve ticari likopen 17.10 ± 5.39 nmol/mg'dır. Bu sonuçlardan farklı olarak, ve $NaAsO_2$, $NaAsO_2$+karpuz suyu, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının protein karbonil değeri ise sırasıyla; 63.94 ± 9.93, 37.15 ± 7.98, 43.29 ± 4.06 ve 40.65 ± 0.97 nmol/mg olarak tespit edildi. 14 gün sonunda kontrol gruplarının protein karbonil miktarları ile arseniğe maruz bırakılmış gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p\leq 0.05$). Arsenikli grupların tamamında protein karbonil miktarlarının daha fazla çıktığı görüldü. Bununla birlikte, $NaAsO_2$+karpuz suyu, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen grubunda protein karbonil değeri arseniğe maruz kalmış diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük tespit edildi. Bu sonuçtan; karpuz suyu, liyofilizat ve ticari likopenin arsenik toksisitesi ile karaciğerde oluşturulmuş oksidatif hasar üzerinde koruyucu etkisi olduğu kanısına varılmaktadır (Tablo 4.4.5.1, Şekil 4.4.4).

Dört haftalık deney protokolünün sonunda gruplarda ölçülen protein karbonil değerleri, kontrol 13.88 ± 1.37 nmol/mg, karpuz suyu 13.07 ± 2.47 nmol/mg, liyofilizat 18.17 ± 0.90 nmol/mg ve ticari likopen 16.55 ± 3.80 nmol/mg'dır. Diğer taraftan, $NaAsO_2$, $NaAsO_2$+karpuz suyu, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının protein karbonil değeri ise sırasıyla; 57.89 ± 6.27, 40.87 ± 5.19, 44.46 ± 9,73 ve 48.52 ± 1.94 nmol/mg olarak tespit edildi. Dört hafta sonunda ölçülen protein karbonil miktarları sonuçları iki hafta sonunda ölçülen değerlerle benzerlik göstermektedir. Ayrıca, elde edilen bu verilere dayanarak arsenik toksisitesi ile karaciğerde oluşturulmuş oksidatif hasarda protein karbonil miktarı değerini en çok düşüren karpuz suyu olduğu bununla birlikte, karpuz suyunun 28 gün boyunca protein

karbonil miktarını düşük tuttuğu tespit edildi (Tablo 4.4.5.2, Şekil 4.4.4). Deneysel çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar Samuel ve ark. (2005)'nın sonuçlarıyla uyum içindedir.

Bu çalışmanın temel bulgusu, arsenik maruziyeti sonucu sıçan karaciğerinde oksidatif protein hasarı meydana geldiğidir. Sonuç olarak, karaciğer protein karbonil konsantrasyonundaki yükselme bunun kanıtı olarak ifade edilebilir. Proteinlerin *in vivo* ve *in vitro* durumlarda ROT hasarına karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, proteinlerin oksidatif hasarları birçok enzimde yapısal değişiklikler ve fonksiyonel inaktivasyona öncülük etmektedir. İnorganik arsenik bir zincir reaksiyon aracılığı ile süperoksit anyon radikali ve hidroksil radikalinin oluşum hızını arttırır (Yamanaka ve ark. 1991). Bu nedenle, arseniğe maruz bırakılmış sıçanlarda protein karbonil seviyesinin yükselmesi ya proteinlerin aşırı oksidasyonu ya da oksidatif hasara uğramış proteinlerin temizlenme kapasitesinde düşüşten kaynaklanmaktadır (Samuel ve ark. 2005).

5.4.5. Lipit Peroksidasyonu

Sıçan karaciğer dokusunda oluşan lipid peroksidasyonu; aldehit ürünlerinden olan MDA miktarı hesaplanarak ölçüldü. 14 gün sonunda kontrol (1. grup), karpuz suyu (3. grup), liyofilizat (4. grup), ticari likopen (5. grup) ve $NaAsO_2$ (6. grup) gruplarında ölçülen MDA değerleri sırasıyla; 9.74 ± 4.04, 5.30 ± 18.36, 2.23 ± 2.21, 11.34 ± 0.91 ve 12.70 ± 0.98 nmol/ml homojenat olarak tespit edildi. $NaAsO_2$+karpuz suyu (7. Grup), $NaAsO_2$+liyofilizat (8. Grup) ve $NaAsO_2$+ ticari likopen (9. Grup) gruplarının MDA değerleri ise sırasıyla; 11.38 ± 8.43, 4.40 ± 2.18 ve 4.85 ± 2.43 nmol/ml homojenat olarak bulundu. Yaptığımız bu çalışmada, 14 gün sonunda MDA değerini en çok düşüren liyofilizat ve ticari likopendir (Tablo 4.4.5.1, Şekil 4.4.5).

28 gün sonunda kontrol (1. grup), karpuz suyu (3. grup), liyofilizat (4. grup), ticari likopen (5. grup) ve $NaAsO_2$ (6. grup) gruplarında ölçülen MDA değerleri sırasıyla; 7.95 ± 1.32, 2.18 ± 1.02, 17.89 ± 5.40, 1.26 ± 1.68 ve 21.37 ± 1.33 nmol/ml homojenat olarak tespit edildi. $NaAsO_2$+karpuz suyu, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının MDA değerleri ise sırasıyla; 7.02 ± 1.08, 4.19 ± 1.24 ve 2.12 ± 0.38 nmol/ml homojenat olarak ölçüldü. 28 gün sonunda da MDA değerini en çok düşüren liyofilizat ve ticari likopen olduğu tespit edildi (Tablo 4.4.5.2, Şekil 4.4.5).

Mohammad ve ark. (2014) karpuz suyunun farelerde düşük doz X-ışınına maruz kalma sonucu oluşan oksidatif strese karşı koruyucu etkisini incelemişler. Karpuz suyu ve normal çeşme suyu ile beslenen farelere düşük doz radyasyon uygulanmış, karaciğer dokusunda meydana gelen MDA düzeyi ölçülmüştür. Karpuz suyu ile beslenen grupta 20.20 ± 0.73 μM, normal çeşme suyu ile beslenen grupta ise 25.63 ± 1.43 μM olarak tespit edilmiştir.

Messarah ve ark. (2013)'nın yaptığı çalışmada, $NaAsO_2$ ile oluşturulmuş toksisitede karaciğer MDA düzeyinin %65 oranında yükseldiği tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada ise, erkek Sprague-Dawley sıçan karaciğerinin MDA düzeyi 6.12 ± 0.53 μmol/l, ticari karpuz tozu kullanılan grubun karaciğer MDA düzeyi 10.37 ± 0.85 μmol/l olarak tespit edilmiştir (Hong ve ark. 2015).

5.4.6. Katalaz Aktivitesi Tayini

Dokularda bulunan antioksidanlar oksidatif strese karşı birincil savaşçıdırlar. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan endojen antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), glutatyon S-transferazlar (GST) ve mitokondriyal sitokrom oksidazlardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon (GSH), melatonin ve E vitaminidir (α-tokoferol). Yüksek seviyelerde ROT üretimi ve/veya yetersiz uzaklaştırılması biyolojik makromoleküllerde oksidatif hasara sebep olmaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücreleri oksidatif hasardan korumak için serbest radikalleri süpürür. Bundan dolayı, bu antioksidanların seviyesi artan serbest radikal tepkimelerinden dolayı düşmektedir (Sheik Abdulazeez ve Thiruvengadam 2013).

Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) antiperoksidatif enzimler olup, hücresel bileşenleri süperoksit anyonu ve H_2O_2'nin zararlı etkilerine karşı korur. Toksisite sırasında H_2O_2'nin birikimi ve serbest radikal üretimi bu enzimlerin inhibisyonu ile sonuçlanır. Likopenin bozulan SOD ve CAT enzim aktiviteleri üzerinde düzenleme etkisi olduğu belirtilmektedir (Sheik Abdulazeez ve Thiruvengadam 2013).

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \quad (16)$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2 \quad (17)$$

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} 2H_2O + GSSG \quad (18)$$

SOD süperoksit anyonunu H_2O_2'ye dönüştürür (Tepkime 16). Daha sonra H_2O_2 CAT ve peroksidaz ile detoksifiye edilerek moleküler oksijen ve suya dönüştürülür (Tepkime 17-18).

Sıçan karaciğer homojenatının bir dakikadaki katalaz aktivitesi (U/ml) ve spesifik katalaz aktivitesi (U/mg) 14 gün ve 28 gün sonunda hesaplandı. 14 gün sonunda kontrol, karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ gruplarında ölçülen CAT aktivitesi değerleri sırasıyla; 28.538 ± 4.90, 20.223 ± 6.80, 24.479 ± 3.58, 28.224 ± 5.61 ve 27.871 ± 3.93 U/ml olarak ölçüldü. $NaAsO_2$+karpuz suyu, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının CAT aktivitesi değerleri ise sırasıyla; 25.302 ± 1.90, 31.049 ± 2.44 ve 30.314 ± 1.43 U/ml olarak tespit edildi. Yaptığımız bu çalışmada, 14 gün sonunda karpuz suyu ve liyofilizatın kendi başına CAT aktivitesini düşürdüğü, arsenikle beraber yükselttiği belirlendi. Bundan farklı olarak, ticari likopen tek kullanıldığında CAT aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken arsenikle beraber sıçanlara verildiğinde aktiviteyi yükselttiği gözlendi (Tablo 4.4.6.1).

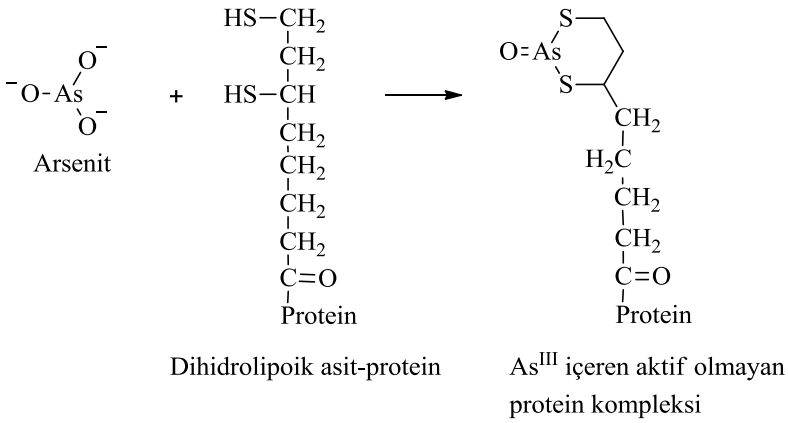
28 gün sonunda kontrol, karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve $NaAsO_2$ gruplarında ölçülen CAT aktivitesi değerleri sırasıyla; 30.908 ± 1.58, 21.530 ± 2.33, 18.577 ± 1.86, 27.798 ± 3.29 ve 24.887 ± 2.12 U/ml olarak tespit edildi. $NaAsO_2$+karpuz suyu, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının CAT aktivitesi değerleri ise sırasıyla; 27.139 ± 1.44, 29.316 ± 5.86 ve 24.751 ± 0.88 U/ml olduğu tespit edildi. Yapılan bu çalışmada 28 gün sonunda karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve arseniğin kendi başına CAT aktivitesini düşürdüğü, karpuz suyu ve liyofilizatın arsenikle beraber aktiviteyi yükselttiği belirlendi. Ayrıca, ticari likopenin arsenikle beraber sıçanlara verildiğinde CAT aktivitesini etkilemediği tespit edildi (Tablo 4.4.6.2).

Hong ve ark. (2015) ticari olarak temin ettikleri karpuz tozunun erkek Sprague-Dawley sıçanlarının karaciğer CAT aktivitesini kontrol grubu 121.82 ± 10.79 nmol/ml

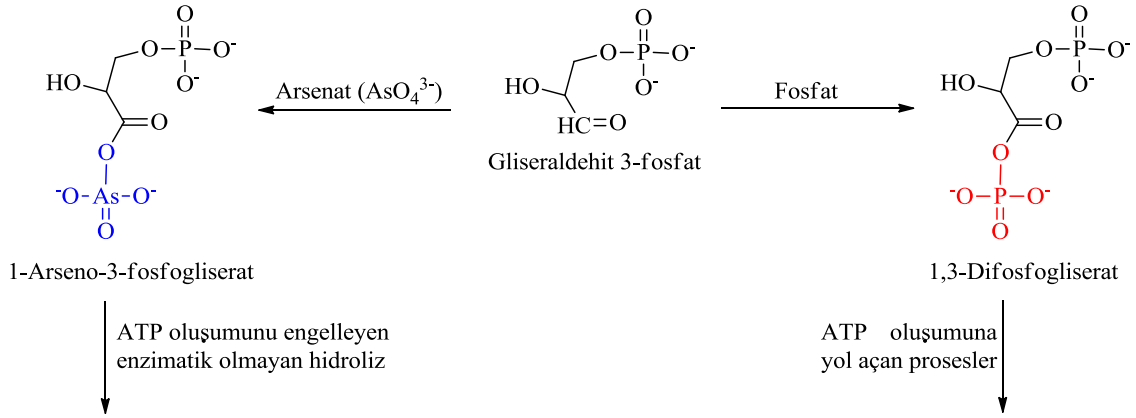
ve kapuz grubu için 160.04 ± 20.64 nmol/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, Sheik Abdulazeez ve Thiruvengadam (2013) likopenin 5, 10, 15 ve 20 mg/kg konsantrasyonlardaki çözeltilerini 3., 6., 9. ve 12. günlerde her bir sıçana intraperitoneal yolla uygulamışlar. Deney sonunda likopen verilen sıçanlarla kontrol grubunun CAT aktivitelerinin aynı olduğu rapor edilmiştir.

Arseniğin en yaygın formları suda çözünebilen arsenat (As^{5+}) ve arsenittir (As^{3+}). Arsenit ortamda bulunan oksijeni kullanarak arsenata dönüşür. Bundan dolayı, aerobik ortamda As^{5+} türleri baskınken, anaerobik koşullarda As^{3+} türleri daha baskındır. Arseniğin farklı yükseltgenme basamakları arasındaki dönüşümleri sırasında ROT meydana gelir ve organ zehirlenmelerine sebep olur. Arseniğe bağlı ROT çoğunlukla NADPH oksidaz aracılı metabolik yollarda meydana gelir**.** Sülfhidril gruplarına bağlanma kapasitesine bağlı olarak hücresel glukoz alınımı, yağ asidi oksidasyonu ve glutatyon üretiminde yer alan birçok enzimin aktivitesi inhibe olur.

İnorganik arsenik solunum yolu veya sindirim sistemine alınır alınmaz, bir seri enzim-katalizli ardışık indirgeme ve metilasyon basamakları aracılığı ile organik arsenikli bileşiklere dönüştürülmektedir. Arsenik etkisini hücrelerin mitokondriyal enzimlerini bozarak gösterir (Şekil 5.4.1). As^{3+} bileşiklerinin proteinlerde bulunan sülfidril gruplarına afinitesi yüksek olduğundan mitokondriyal enzim ilgili proteine olan aktivitesini yitirir, As^{5+} ise hücre reaksiyonlarındaki fosfat ile yarışır ve oksidatif fosforilasyonu ayırarak ATP oluşumunu engeller (Şekil 5.4.2). Şekil 5.4.3'de arsenik zehirlenmesi mekanizması verilmektedir.

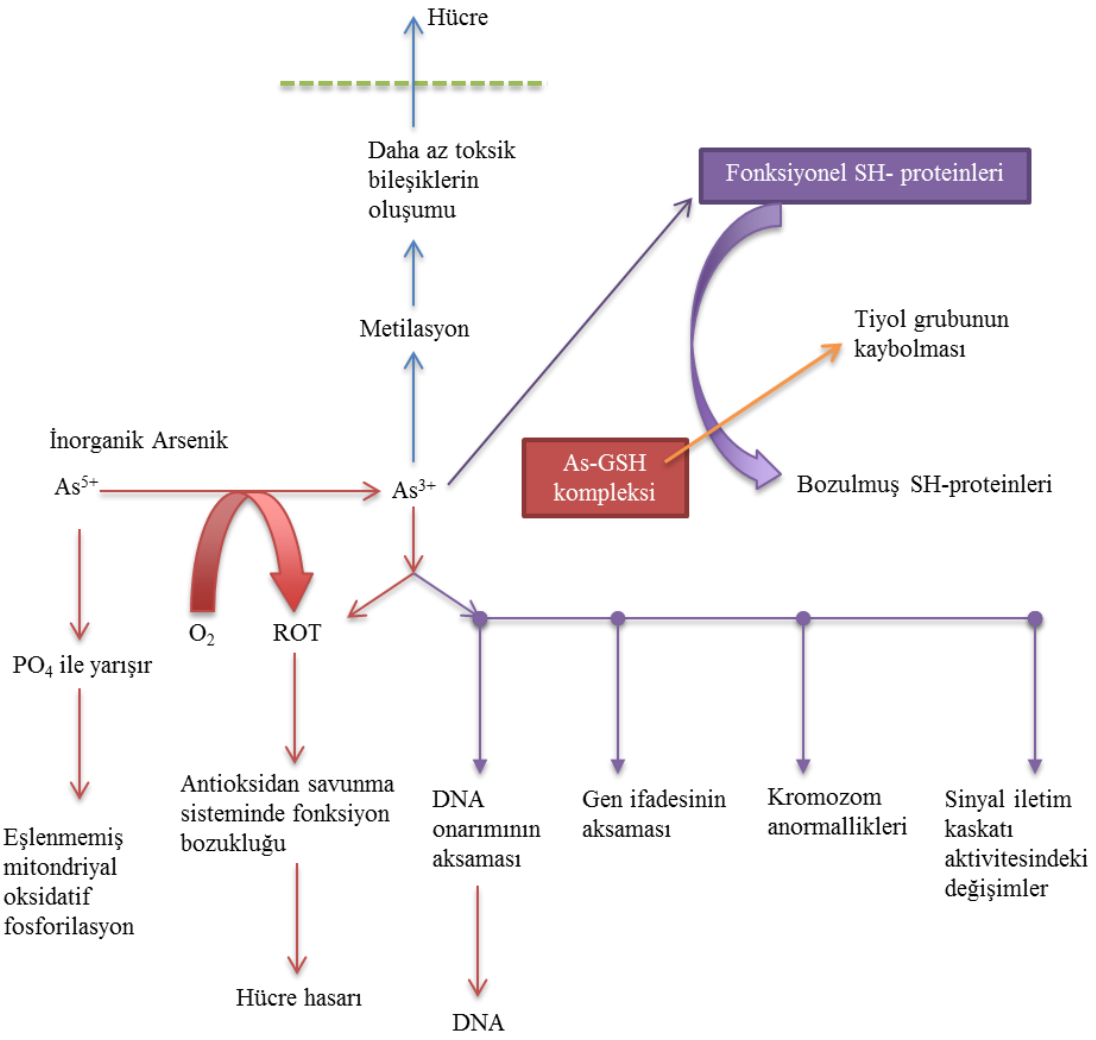


Şekil 5.4.1. Arseniğin enzim sistemi çalışmasını bloke etmesi (Mandal ve Suzuki 2002)



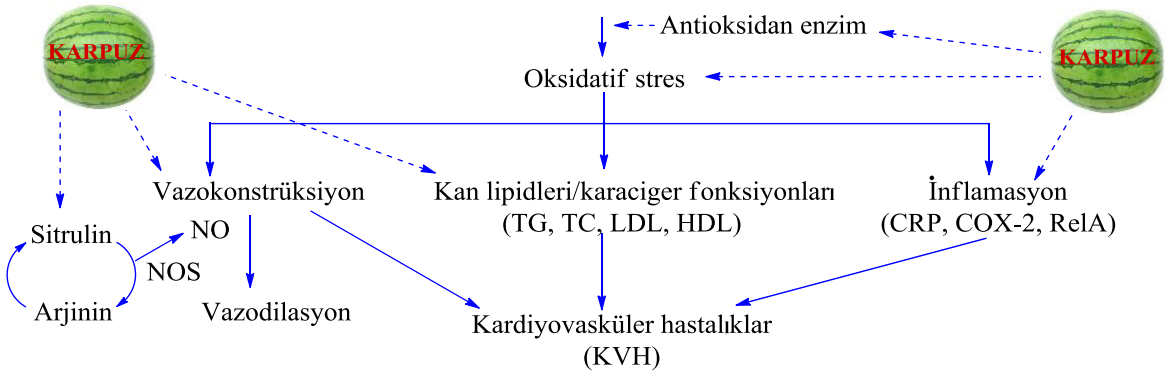
Şekil 5.4.2. Arseniğin ATP oluşumunu engelleme reaksiyonu (Mandal ve Suzuki 2002)

Bu tez çalışmamızda, arsenik ($NaAsO_2$) uygulanan sıçanlarda 14 gün ve 28 gün sonra oluşan hasara karşı karpuzun koruma etkisi araştırıldı. Elde ettiğimiz veriler ışığında, 14 gün sonunda kontrol, karpuz suyu, liyofilizat ve ticari likopen gruplarında bulunan sıçanların genel sağlıklarında bozulma olmadığı gözlendi. Ancak, arseniğe maruz bırakılmış sıçanların genel sağlık durumunda bozulma olduğu, karpuz suyu ve ticari likopenin bu durumu iyileştirme yönünde pozitif etki gösterdiği tespit edildi. Dört hafta (28 gün) sonunda $NaAsO_2$+liyofilizat grubu dışında diğer bütün gruplarda başlangıca göre kilo artışı kaydedildi. Bu sonuçlara göre, arsenik verilmeyen sıçanların 28 gün sonunda genel sağlık durumunda bozulma olmadığı, $NaAsO_2$'ın sıçanların kilo almalarını ve büyümelerini olumsuz yönde etkilediğini düşünmekteyiz.



Şekil 5.4.3. Arsenik zehirlenmesi mekanizması (Flora ve ark. 2007)

Karpuz sitrulin amino asidi bakımından zengin doğal bir kaynaktır. Sitrulin insanlar için esansiyel bir amino asit olan arginine metabolize olur. Arginin bütün bitkilerde mevcuttur ve memeli nitrik oksit (NO) sentezinde yer alıp, kardiyovasküler ve immün fonksiyonlarda rol almaktadır. Sitrulin nitrik oksit sistemini uyararak insanlarda vazodilasyonun sağlanmasına yardımcı olur. Bunun sonucu olarak da kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağlar. Bununla birlikte, karpuzun antioksidan enzim aktivitelerini yükseltir, oksidatif stres ve inflamasyon sonucu meydana gelen serbest radikalleri etkisizleştirir (Şekil 5.4.4).



Şekil 5.4.4. Karpuzun oksidatif streste etkilediği biyokimyasal durumlar (Mondal ve ark. 2013)

Bu tez çalışmasında, iki hafta sonunda $NaAsO_2$ grubunun glukoz değeri kontrol grubuna göre daha düşük, karpuz suyunun ise daha yüksek ölçüldü. Genel olarak kan glukoz seviyesinin düştüğü tespit edildi. Dört haftalık süre (28 gün) sonunda kan glukoz değeri kontrol grubuna en yakın olan karpuz suyu grubu olduğu belirlendi. Bunun tersine, $NaAsO_2$ grubunda glukoz düzeyinin düştüğü tespit edildi. Ayrıca, $NaAsO_2$ grubu dışındaki bütün sıçanların kan glukoz seviyelerinin yükseldiği gözlemlendi. Deneysel çalışmamızın her iki periyodunda da karpuz suyu, ticari likopen ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarında glukoz seviyesinin kontrol grubuna göre yükselmesi ile $NaAsO_2$ grubunda düşmesi uyum içindedir.

Mevcut çalışmamızda, iki hafta (14 gün) sonunda liyofilizat grubu diğer bütün grupların kan serumundaki trigliserid oranın kontrol grubuna göre oldukça yükseldiği tespit edildi. 28 günlük uygulama sonunda ise, bütün gruplarda trigliserid seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük ölçüldü.

İki hafta sonunda karpuz suyu verilen sıçanların serum kolesterol değeri kontrol grubununkine eşit ölçüldü. $NaAsO_2$ ve $NaAsO_2$+ticari likopen ile beslenen sıçanların kolesterol seviyesinde kontrol grubuna göre artış tespit edildi. 28 gün sonra ise karpuz suyu, $NaAsO_2$ ve $NaAsO_2$+ticari likopen grubunun serum kolesterol seviyesinin düşürdüğü; geri kalan diğer grupların kan kolesterol seviyesinin kontrol grubuna göre yükseldiği tespit edildi.

Yaptığımız çalışmada elde edilen mevcut sonuçlar şöyledir; iki hafta sonunda $NaAsO_2$, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının AST değeri kontrol grubunun AST değerine göre yükselmiştir. Diğer taraftan, $NaAsO_2$+karpuz suyu

grubunun değeri ise kontrol grubuna göre düşük çıkmıştır. ALT sonuçlarına baktığımızda ise; 14 gün sonunda ALT değeri yüksek çıkan gruplar; $NaAsO_2$, $NaAsO_2$+liyofilizat ve $NaAsO_2$+ticari likopendir. $NaAsO_2$+karpuz suyu grubunda ALT değeri düşmüştür. 28 gün sonunda ise; sadece $NaAsO_2$ grubunun hem AST hem de ALT değeri kontrol ve diğer bütün gruplara göre yükselmiştir. Elde ettiğimiz bu verilerden; 14 gün ve 28 gün arsenik uygulaması sonucu sıçanlarda karaciğer hasarı oluştuğu, karpuz suyunun ve liyofilizatın oluşan bu hasara karşı yüksek oranda koruma sağladığı tespit edildi. Buna ilaveten 14 gün sonunda ticari likopenin koruma etkisinin olmadığı, diğer taraftan 28 gün sonunda ticari likopenin karpuz suyundan daha yüksek oranda koruma sağladığı gözlendi. Bu parametrelerde sonuç olarak; 28 gün sonunda karpuz suyu, liyofilizat ve ticari likopenin AST ve ALT değerleri üzerinde koruma etkisi gösterdiğini söyleyebiliriz.

Yaptığımız hayvan deneyi çalışmasında, 14 gün sonra $NaAsO_2$+karpuz suyu verilen sıçan grubu dışındaki diğer bütün gruplarda kontrol grubuna göre serum albumin değerinde azalma veya artma kaydedildi. Diğer taraftan, 28 gün sonunda kontrol grubu ile karşılaştırınca serum albumin değeri en çok düşen $NaAsO_2$ grubudur. Sonuç olarak, 28 günlük uygulama sonunda karpuz suyu ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının albumin değerinin aynı olduğu tespit edildi.

Yapılan bu deneysel çalışmada; iki hafta sonunda $NaAsO_2$ ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarındaki sıçanların kan serumunda toplam bilirubin seviyesinin önemli oranda yükseldiği tespit edildi. Dört hafta sonunda ise karpuz suyu ve $NaAsO_2$+ticari likopen gruplarının bilirubin değerlerinin düştüğü, $NaAsO_2$ grubunun bilirubin seviyesinde yükselme ölçülmüştür.

Giniş ve Onat (2010) kan numunesi alınırken stazın (venöz kanın geri dönüşünde ağırlaşma ile belirgin durum) venöz kanda ALT, albumin, bilirubin seviyelerinde %2-10 oranında artışa, glukoz seviyesinde ise %2-5 oranında azalmaya neden olduğunu ifade etmektedirler.

Protein karbonil grupları serbest radikallerin neden olduğu protein oksidasyonu için önemli belirteçlerdir. Proteinlerdeki oksidatif hasar; protein karbonil (PCO) düzeyinin yükselmesi ve protein tiyol (PSH) seviyesinin düşmesi ile kendini gösterir.

Arsenik uygulaması sonucu sıçan karaciğer dokusunda oluşan protein karbonil miktarı 14 gün ve 28 gün sonra ölçüldü. 14 gün sonunda kontrol gruplarının protein karbonil miktarları ile arseniğe maruz bırakılmış gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p \leq 0.05$). Arsenikli grupların tamamında protein karbonil miktarları daha yüksek çıkmıştır. Bu sonuçtan; 14 gün sonunda karpuz suyu, liyofilizat ve ticari likopenin arsenik toksisitesi ile karaciğerde oluşturulmuş oksidatif hasar üzerinde koruyucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz. Dört hafta sonunda ölçülen protein karbonil miktarları sonuçları iki hafta sonunda ölçülen değerlerle benzerlik göstermektedir. Ayrıca, elde edilen bu verilere dayanarak arsenik toksisitesi ile karaciğerde oluşturulmuş oksidatif hasarda protein karbonil miktarı değerini en çok düşüren karpuz suyu olduğu bununla birlikte, karpuz suyunun 28 gün boyunca protein karbonil miktarını düşük tuttuğu tespit edildi. Bu çalışmanın temel bulgusu, arsenik maruziyeti sonucu sıçan karaciğerinde oksidatif protein hasarı meydana geldiğidir. Sonuç olarak, karaciğer protein karbonil konsantrasyonundaki yükselme bunun kanıtı olarak ifade edilebilir (Şekil 5.4.5).

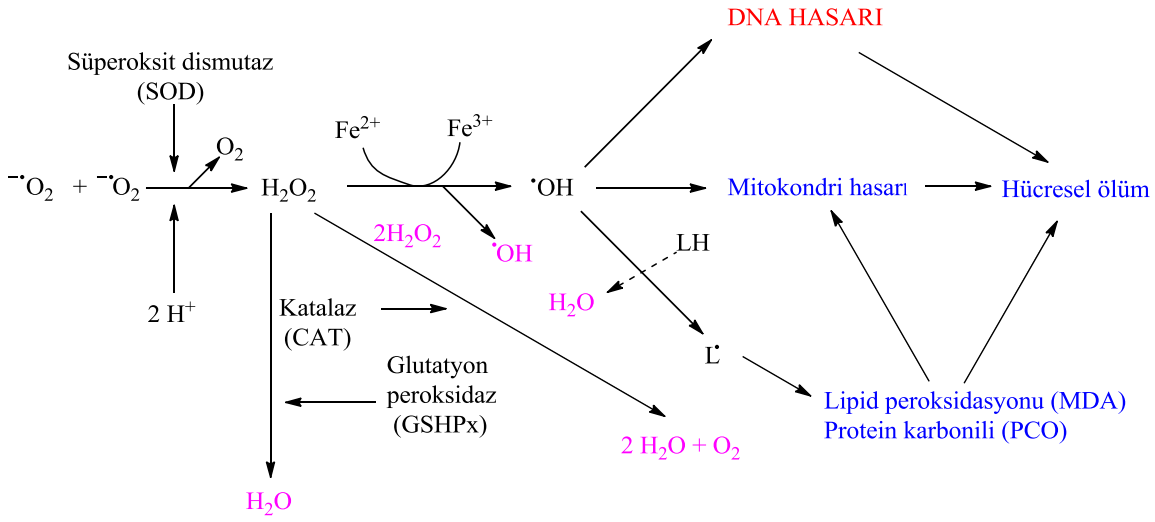
Sıçan karaciğer dokusunda oluşan lipid peroksidasyonu; aldehit ürünlerinden olan MDA miktarını 14 gün ve 28 gün sonunda en çok düşüren liyofilizat ve ticari likopendir.

Serbest radikaller antioksidan enzimler SOD, CAT ve glutayon peroksidaz (GSH-Px) tarafından suya indirgenir. Hidroperoksitten hidroksil radikallerinin oluşması oksidatif hücre hasarı; DNA hasarı, protein karboksilasyonu ve mitokondriyal membranların lipidlerini de kapsayan lipid peroksidasyonu gelişir. Oksidatif hasar bu yolaklar ile hücre ölümüne yol açmaktadır (Garcıa-Fernandez ve ark. 2008) (Şekil 5.4.5).

Dokularda bulunan antioksidanlar oksidatif strese karşı birincil savaşçıdırlar. Yaptığımız bu çalışmada, 14 gün sonunda karpuz suyu ve liyofilizatın kendi başına CAT aktivitesini düşürdüğü, arsenikle beraber yükselttiği belirlendi. Bundan farklı olarak, ticari likopen tek kullanıldığında CAT aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken arsenikle beraber sıçanlara verildiğinde aktiviteyi yükselttiği gözlendi. 28 gün sonunda karpuz suyu, liyofilizat, ticari likopen ve arseniğin kendi başına CAT aktivitesini

düşürdüğü, karpuz suyu ve liyofilizatın arsenikle beraber aktiviteyi yükselttiği belirlendi.

Likopenin bozulan SOD ve CAT enzim aktiviteleri üzerinde düzenleme etkisi olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 5.4.5. Oksidatif hücresel hasar mekanizmaları (Garcıa-Fernandez ve ark. 2008)

Bu çalışma, Diyarbakır karpuzunun antioksidan özelliklerinin araştırılmasına yönelik yapılan ilk tez araştırmasıdır.

Bu doktora tez kapsamında çalışılan Diyarbakır karpuzu suyu ve liyofilizatına ait bulguların sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

Karpuz suyu ve liyofilizatının toplam fenolik ve flavonoid bileşik ile likopen miktarının yüksek olduğu tespit edildi. DPPH, ABTS ve hidroksil radikallerini söndürme aktivitesi ile metal şelatlama aktivitesi, hidrojen peroksit süpürme etkisi ve indirgeme gücü olduğu bulundu. Ayrıca, C vitamini ve toplam şeker oranının yüksek olduğu belirlendi. Antioksidan aktivitelerinin yanında, insan vücudu için gerekli olan ana grup elementler Na, K, Ca ve Mg ile eser elementler olan Fe, Mn, Zn, Co, Cu ve Se bakımından zengin olduğu, bunlardan farklı olarak, liyofilizatta protein miktarının yüksek olduğu tayin edildi. Karpuzda bulunan sitrulin amino asidi esansiyel bir amino asit olan arginine metabolize olmaktadır. Arginin de nitrik oksit sentezinde rol almaktadır. Nitrik oksit ise kardiyovasküler hastalıklar ve immün fonksiyonlarda etkili

olup vazodilatasyonun sağlanmasına yardımcı olur. Bu özelliklere ilaveten, liyofilizatın fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikallerinin BSA'da meydana getirdiği oksidatif hasar ve H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikallerinin supercoiled DNA'da meydana getirdiği hasara karşı yüksek koruma gösterdiği tespit edildi.

Likopenin apoptoz ve hücre döngü tutuklaması yoluyla anti-tümör etki gösterdiği literatürde bildirilmektedir. Karpuz suyu liyofilizatının 24 saatlik uygulama sonucu MCF-7, HepG2 ve BeWo hücre hatlarının canlılığı üzerine yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği ölçüldü. Belli kanser hücre hatlarında gösterdiği anti-tümör özelliği ile birlikte, *V. fischeri* bakterisinin canlılığı üzerine toksik etki göstermediği belirlendi.

Arsenik tabiatta var olan bir element olup gıda, toprak ve suda bulunur, doğal ve yapay kaynaklardan ortama salıverilir. Arseniğin en yaygın formları organik arsenat (As^{5+}) ve inorganik arsenit (As^{3+}) olup, arsenit daha çok zehirli olandır. İnsan vücudu için eser ağır metal veya zehirli olan arsenik sağlıklı bir organizmada bulunmamalıdır. Arsenik ağızdan alındıktan sonra çözünen arsenik bileşikleri sindirim kanalında absorblanır ve kan yoluyla karaciğer, böbrek, dalak, akciğerler ve birçok organa dağılır. Karaciğer, arsenik zehirlenmesinde önemli hedef organdır. Arseniğin farklı yükseltgenme basamakları arasındaki dönüşümleri sırasında ROT meydana gelir ve organ zehirlenmelerine sebep olur. Dünyada milyonlarca insan içme suları ile toprak ve kil yeme alışkanlığından dolayı inorganik arseniğe maruz kalmaktadır. İki hafta (14 gün) ve dört hafta (28 gün) boyunca $NaAsO_2$ ile muamele edilen sıçanlarda Diyarbakır karpuzunun kan serumunda glukoz ve trigliserid düzeyini kontrol ettiğini, yükselen AST ve ALT değerlerini düşürdüğü ve düşen albumin seviyesini yükselttiği tespit edildi. Ayrıca, arsenik maruziyeti sonucu sıçan karaciğerinde meydana gelen oksidatif protein hasarı ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma ve iyileştirme etkisi olduğu belirlendi. Tespit edilen bu özelliklerinden dolayı günlük tüketimde karpuza daha çok yer verilebilir.

Günümüzde, geleceğe yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları hızla devam etmektedir. Bu tip çalışmalarda yüksek antioksidan aktiviteye sahip ürünler belirlenerek, bunların gıda sistemlerinde antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Acharyya, N., Ali, S.S., Deb, B., Chattopadhyay, S., Mait, S. 2015. Green tea (*Camellia sinensis*) alleviates arsenic-induced damages to DNA and intestinal tissues in rat and *in situ* intestinal loop by reinforcing antioxidant system. ***Environmental Toxicology and Chemistry***, 30(9):1033-1044.

Akkuş, İ. 1996. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 157, Konya.

Akşit, H., Bildik, A. 2008. Apoptozis. ***Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi***, 19(1): 55-63.

Al Rmallia, S.W., Haris, P.I., Harringtonb, C.F., Ayub, M. 2005. A survey of arsenic in foodstuffs on sale in the United Kingdom and imported from Bangladesh. ***Science of the Total Environment***, 337: 23-30.

Alp, N.J., Channon, K.M. 2004. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. ***Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology***, 24: 413-420.

Altaş, S. 2009. *Cedrus libani* (Sedir) ve *Abies clicia* (Köknar) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 146.

Altaş, S., Kızıl, G., Kızıl, M., Ketani, A., Haris, P.I. 2011. Protective effect of Diyarbakır watermelon juice on carbon tetrachloride-induced toxicity in rats. ***Food and Chemical Toxicology***, 49: 2433-2438.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahim-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. 2004. Free radical-scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian praires. ***Food Chemistry***, 84: 551-562.

Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L. 2013. Antioxidant activity of essential oils. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 61: 10835-10847.

Atabey, E. 2011. İnsanlardaki kil ve toprak yeme alışkanlığı. ***Cumhuriyet Bilim ve Teknoloji Dergisi***, 1288: 9.

Atkinson, S. 2015. Filtration technology verified to remove arsenic from drinking water. Environmental Protection Agency, http://www3.epa.gov/, 03.12.2015.

Ayala-Fierro, F., Barber, D.S., Rael, L.T., Carter, D.E. 1999. *In vitro* tissue specificity for arsine and arsenite toxicity in the rat. ***Toxicological Sciences,*** 52: 122-129.

Aydemir, T., Becerik, S. 2011. Phenolic content and antioxidant activity of different extracts from *Ocımum basilicum*, *Apıum graveolens* and *Lepidium sativum* seeds. ***Journal of Food Biochemistry***, 35: 62-79.

Ayepola, O.R., Brooks, N.L., Oguntibeju, O.O. 2014. Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids, Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health. http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-human-health/oxidative-stress-and-diabetic-complications-the-role-of-antioxidant-vitamins-and-flavonoids, 03.12.2015.

Ayres, R.U. 1992. Toxic heavy metals: Materials cycle optimization. ***Proceedings of the National Academy of Sciences,*** 89: 815-820.

Barbunsinski, K. 2009. Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. ***Ecological Chemistry and Ehgineering S***, 16(3): 347-358.

Başkan, M.B., Pala, A. 2009. Arsenic contamination in drinking water: An assesment for Turkey. ***Pamukkale University Engineering Faculty Journal of Engineering Sciences***, 15(1): 69-79.

Bayraktar, K.N. 1981. Studies on th eprocessing and utilization of two Turkish lignites: Ph.D. Thesis, The University of Birmingham, 273.

Beysanoğlu, Ş. 1977. Diyarbakır Karpuzu ve bazı maniler. ***Elek Dergisi***, 2(11): 22-23.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. ***Nature***, 181: 1199-1200.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, 72: 248-254.

Brima, E.I., Jenkins, R.O., Haris, P.I. 2006. Understanding arsenic metabolism through spectroscopic determination of arsenic in human urine. ***Spectroscopy***, 20: 125-151.

Butterfield, D.A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenova, M., Carney, J. 1998. Structural and functional changes in proteins induced by free radical mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, 854: 448-462.

Chance, B., Maehly, C. 1955. Assay of catalase and peroxidases. ***Methods in Enzymology***, 2(11): 764-775.

Chatterjea, M.N., Shinde, R. 2002. Text Book of Medical Biochemistry. 5th ed. Jaypee Brothers, Medical Publishers Ltd, 317, New Delhi.

Choo, W.S., Sin, W.Y. 2012. Ascorbic acid, lycopene and antioxidant activities of red-fleshed and yellow-fleshed watermelons. ***Advances in Applied Science Research***, 3(5): 2779-2784.

Choong, T.S.Y., Chuah, T.G., Robiah, Y., Koay, F.L.G., Azni, I. 2007. Arsenic toxicity, health hazards and removal techniques from water: an overview. ***Desalination***, 217: 139-166.

Chun, J., Lee, J., Eitenmiller, R.R. 2005. Vitamin E and oxidative stability during storage of raw and dry roasted peanuts packaged under air and vacuum. ***Journal of Food Science***, 70: 292-297.

Collins, J.K., Wu, G., Perkins-Veazie, P., Spears, K., Claypool, P.L., Baker, R.A., Clevidence, B.A. 2007. Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. ***Nutrition***, 23: 261-266.

Contreras-Calderon, J., Calderon-Jaimes, L., Guerra-Hernandez, E., Garcia-Villanova, B. 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. ***Food Research International***, 44: 2047-2053.

Cunningham, F.X., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J., Gantt, E. 1994. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the *Cyanobacterium synechococcus* sp strain PCC7942. ***The Plant Cell***, 6: 1107-1121.

Çamtepe, Y. 2006. Kolonkaya kuyusunda arsenik. Akşam Gazetesi. Uşak.

Çolak, M., Gemici, Ü., Tarcan, G. 2003. The effects of colemanite deposits on the arsenic concentrations of soil and groundwater in İğdeköy-Emet, Kütahya, Turkey. 149: 127-143.

Çöl, M., Çöl, C. 2004. Arsenic concentrations in the surface, well, and drinking waters of the Hisarcık, Turkey Area. 10: 461-465.

Dane, F., Liu, J. 2007. Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). ***Genetic Resources and Crop Evolution***, 54(6): 1255-1265.

Debbache, N., Atmani, D., Atmani, D. 2014. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. ***Industrial Crops and Products***, 53: 85-92.

Deshmukh, C.D., Jain, A., Tambe, M.S. 2015. Phytochemical and pharmacological profile of *Citrullus lanatus* (Thunb). ***Biolife***, 3(2): 483-488.

Dharmaraj, U., Malleshi, N.G. 2011. Changes in carbohydrates, proteins and lipids of finger millet after hydrothermal processing. ***LWT-Food Science and Technology***, 44: 1636-1642.

Diehl, J.A. 2003. Cycling to cancer with cyclin D1. ***Cancer Biology and Therapy***, 1(3): 226-231.

Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M. 1994. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, 315: 161-169.

Djuric, Z., Powell, L.C. 2001. Antioxidant capacity of lycopene-containing foods. ***International Journal of Food Sciences and Nutrition***, 52: 143-149.

Dubey, A., Forster, M.J., Lal, H., Sohal, R.S. 1996. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and behavioral functions of the mouse. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, 333: 189-197.

Edwards, A.J., Vinyard, B.T., Wiley, E.R., Brown, E.D., Collins, J.K., Perkins-Veazie, P., Baker, R.A., Clevidence, B.A. 2003. Consumption of watermelon juice increases plasma concentrations of lycopene and β-carotene in humans. ***The Journal of Nutrition***, 133: 1043-1050.

El-Adawy, T.A., Taha, K.M. 2001. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 49(3): 1253-1259.

El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Radwan, F.M.E. 2009. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. ***Food and Chemical Toxicology***, 47(1): 249-254.

Elinder, L.S., Hadell, K., Johansson, J., Molgaard, J., Holme, I., Olsson, A.G., Walldius, G. 1995. Probucol treatment decreases serum concentrations of diet-derived antioxidants. ***Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology***, 15: 1057-1063.

Emen Tanrıkut, S., Çeken, B., Altaş, S., Pirinççioğlu, M., Kızıl, G., Kızıl, M. 2013. DNA cleavage protecting activity and *in vitro* antioxidant potential of aqueous extract from fresh stems of *rheum ribes*. ***Acta Alimentaria***, 42(4): 461-472.

Erdol, S., Ceylan, S. 1997. Bursa yöresinde içme ve kullanma sularında arsenikle kirlenmenin araştırılması. ***Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi***, 16: 119-127.

Everson, K.M., McQueen, C.E. 2004. Lycopene for prevention and treatment of prostate cancer. ***American Journal of Health-System Pharmacy***, 61: 1562-1566.

Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., Saso, L. 2011. Antioxidant therapy: current status and future prospects. ***Current Medicinal Chemistry***, 18: 3871-3888.

Fish, W.W., Perkins-Veazie, P., Collins, J.K. 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. ***Journal of Food Composition and Analysis***, 15: 309-317.

Flora, S.J.S., Bhadauria, S., Kannan, G.M., Singh, N. 2007. Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: A review. ***Journal of Environmental Biology***, 28(2): 333-347.

Ford, N.A., Elsen, A.C., Zuniga, K., Lindshield, B.L., Erdman, J.W.Jr. 2011. Lycopene and apo-12'-lycopenal reduce cell proliferation and alter cell cycle progression in human prostate cancer cells. ***Nutrition and Cancer***, 63(2): 256-263.

Foti, M.C. 2007. Antioxidant properties of phenols. ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, 59: 1673-1685.

Fraga, C.G. 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. ***Molecular Aspects of Medicine***, 26: 235-244.

Friedman, M. 2013. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α-tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 61: 9534-9550.

Fukuhara, K., Miyata, N. 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. ***Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters***, 8(22): 3187-3192.

Galano, A., Francisco-Marquez, M. 2009. Reactions of OOH radical with β-carotene, lycopene, and torulene: hydrogen atom transfer and adduct formation mechanisms. ***The Journal of Physical Chemistry B***, 113: 11338-11345.

Garcıa-Fernandez, M., Delgado, G., Puche, J.E., Gonzalez-Baron, S., Cortazar, I.C. 2008. Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. ***Endocrinology***, 149(5): 2433-2442.

Gemici, Ü., Tarcan, G., Helvacı, C., Somay, A.M. 2008. High arsenic and boron concentrations in groundwaters related to mining activity in the Bigadiç Borate Deposits (Western Turkey). ***Applied Geochemistry***, 23: 2462-2476.

Giniş, Z., Onat, A. 2010. Klinik Biyokimya Laboratuvarı Test Rehberi. Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, 28.

Gloria, N.F., Soares, N., Brand, C., Oliveira, F.L., Borojevic, R., Teodoro, A.J. 2014. Lycopene and *beta*-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. ***Anticancer Research***, 34(3): 1377-1386.

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y. 2006. Algal antioksidanlar. ***Ege Unıversity Journal of Fisheries and Aquatic Sciences***, 23(1): 85-89.

Guo, S., Zhang, J., Sun, H., Salse, J., Lucas, W., Zhang, H., Zheng, Y., Mao, L., Ren, Y., Wang, Z. 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. ***Nature Genetics***, 45: 51-58.

Gutteridge, J., Halliwell, B. 2002. "Antioxidant protection and oxygen radical signaling." reactive oxygen species in biological systems. ***Springer US***, 189-218.

Gülçin, İ. 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. ***Life Sciences***, 78: 803-811.

Güler, A. 1978. Diyarbakır Karpuzu ve Karpuzla ilgili Maniler. ***Türk Folklor Araştırmaları Dergisi***, 27(342): 8210.

Habtemariam, S. 2007. Antioxidant activity of knipholone anthrone. ***Food Chemistry***, 102: 1042-1047.

Halliwel, B., Gutterindge, J.M.C. 2000. Free Radicals in Biology and Medicine, 3.ed. Oxford, ISSN: 0891-5849, New York.

Halliwell, B. 1999. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. ***Mutation Research***, 443: 37-52.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. ***Cell***, 100: 57-70.

Hartree, E.E. 1972. Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. ***Analytical Biochemistry***, 48: 422-427.

Hasler, C.M. 1998. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. ***Journal of Food Technology***, 52: 63-69.

Hekimoğlu, A. 2010. Likopenin antikarsinojenik etki mekanizmaları. ***Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi***, 25(1): 57-62.

Hernandez-Marin, E., Galano, A., Martinez, A. 2013. *Cis* carotenoids: Colorful molecules and free radical quenchers. ***Journal of Physical Chemistry B***, 117: 4050-4061.

Hollman, P.C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling,E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., Vidry, S. 2011. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. ***Journal of Nutrition***, 141: 989-1009.

Hong, M.Y., Hartig, N., Kaufman, K., Hooshmand, S., Figueroa, A., Kern, M. 2015. Watermelon consumption improves inflammation and antioxidant capacity in rats fed an atherogenic diet. ***Nutrition Research***, 35: 251-258.

Hu, M.L. 2011. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: More questions than answers. ***Chang Gung Medical Journal***, 34: 449-46O.

Hughes, M.F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. ***Toxicology Letters,*** 133: 1-16.

Hwang, E.S., Bowen, P.E. 2004. Cell cycle arrest and induction of apoptosis by lycopene in LNCaP human prostate cancer cells. ***Journal of Medicinal Food***, 7: 284-289.

Ionita, P. 2005. Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species? ***Chemical Papers***, 59(1): 11-16.

Isabelle, M., Lee, B.L., Lim, M.T., Koh, W-P., Huang, D., Ong, C.N. 2010. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. ***Food Chemistry***, 123: 77-84.

Jain, C.K., Ali, I. 2000. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. ***Water Research***, 34: 4304-4312.

Jetawattana, S. 2005. Lycopene, a powerful antioxidant. Department of Radiation Oncology Free Radical and Radiation Biology, The University of Iowa, IA 52242-1181.

John, M.C., Gutteridge, J.M.C., Halliwel, B. 1988. The deoxyribose assay: an assay both for free hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. ***Biochemical Journal,*** 253(3): 932-933.

John, M.C., Gutteridge, J.M.C., Halliwel, B. 1988. The deoxyribose assay: An assay both for free hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. ***Biochemical Journal,*** 253(3): 932-933.

Kahles, T., Brandes, R.P. 2013. Which NADPH oxidase isoform is relevant for ischemic stroke? The case for nox 2. ***Antioxidant Redox Signaling***, 18: 1400-1417.

Kaiser, K.L.E., Palabrica, V.S., 1991. Photobacterium phosphoreum toxicity data index. ***Water Pollution Research Journal of Canada,*** 26: 361-431.

Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., Germano, I. 2003. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. ***Cancer Research***, 63: 2103-2108.

Karakoç, V. 2013. Arsenik Baskılanmış Nanopartiküllerle Çevre Sularından Arsenik Uzaklaştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 137.

Karas, M., Amir, H., Fishman, D., Danilenko, M., Segal, S., Nahum, A., Koifmann, A., Giat, Y., Levy, J., Sharoni, Y. 2000. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. ***Nutrition and Cancer***, 36(1): 101-111.

Kawasaki, S., Miyake, C., Kohchi, T., Uchida, M. Yokota, A. 2000. Responses of wild watermelon to drought stress: accamulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits. ***Plant and Cell Physiology***, 41(7): 864-873.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. ***British Journal of Cancer***, 26(4): 239-257.

Kienen, V., Costa, W.F., Visentainer, J.V., Souza, N.E., Oliveira, C.C. 2008. Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement. ***Talanta***, 75: 141-146.

Kim, C.H., Park, M.K., Kim, S.K., Cho, Y.H. 2014. Antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of lycopene in watermelon. ***International Journal of Food Science and Technology***, 49: 2083-2091.

Kim, S.J., Matsushita, Y., Fukushima, K., Aoki, D., Yagami, S., Yuk, H.G., Lee, S.C. 2014. Antioxidant activity of a hydrothermal extract from watermelons. ***LWT-Food Science and Technology***, 59: 361-368.

Krinsky, N.I., Yeum, K.J. 2003. Carotenoid-radical interactions. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 305: 754-760.

Kumar, A., Chattopadhyay, S. 2007. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. ***Food Chemistry***, 100: 1377-1384.

Kumaran, A., Karunakaran, R.J. 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. ***LWT-Food Science and Technology***, 40: 344-352.

Kumari, A., Rao, J., Kumari, J., Sharma, N., Jain, P., Dave, V., Sharma, S. 2013. Analgesic activity of aqueous extract of *Citrullus lanatus* Peels. ***Advances in Pharmacology and Pharmacy***, 1(3): 135-138.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. ***Nature***, 227(5259): 680-685.

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenge. ***Progress in Lipid Research***, 46: 244-282.

Lanigan, R.S., Yamarik, T.A. 2002. Final report on the safety assessment of BHT. ***International Journal of Toxicology***, 21(2): 19-94.

Leong, L.P., Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. ***Food Chemistry***, 76: 69-75.

Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. ***Food Chemistry***, 125: 288-306.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. ***Methods in Enzymology***, 186: 464-478.

Lia, M.S., Hsueh, Y.M., Chen, C.J., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Kuo, T.L., Wu, M.M., Tai, T.Y. 1994. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. ***American Journal of Epidemiology***, 139(5): 484-492.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. ***Journal of Biological Chemistry***, 193: 265-275.

Maalesef, D., Kuntıc, V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids *via* metal-flavonoid complexing reactions. ***Journal of the Serbian Chemical Society***, 72: 921-939.

Mandal, B.K., Suzuki, K.T. 2002. Arsenic round the world: A review. ***Talanta***, 58: 201-235.

Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R. 2009. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. ***Antioxidants and Redox Signaling***, 11: 669-702.

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 43: 1813-1819.

Messarah, M., Klibet, F., Boumendjel, A., Abdennour, C., Bouzerna, N., Boulakoud, M.S., El Feki, A. 2012. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. ***Experimental and Toxicologic Pathology***, 64: 167-174.

Messarah, M., Saoudi, M., Boumendjel, A., Kadeche, L., Boulakoud, S.M., Feki, A.E. 2013. Green tea extract alleviates arsenic-induced biochemical toxicity and lipid peroxidation in rats. ***Toxicology and Industrial Health***, 29(4): 349-359.

Modern Water. 2015. Microtox M500: Industry-leading toxicity testing. http://www.ospreyscientific.com/uploads/rusa/fbfd/ProductProfile_MICROTOX.pdf, 02.12.2015.

Mohammad, M.K.A., Mohamed, M.I., Zakaria, A.M., Razak, H.R.A., Saad, W.M.M. 2014. Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai) juice modulates oxidative damage induced by low dose X-ray in mice. ***BioMed Research International***, Article ID 512834: 1-6.

Mohan, D., Pittman, C.U. 2007. Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents-A critical review. ***Journal of Hazardous Materials***, 142: 1-53.

Mondal, S., Mukherjee, S., Chaudhuri, K., Kabir, S.N., Kumar Mukhopadhyay, P. 2013. Prevention of arsenic-mediated reproductive toxicity in adult female rats by high protein diet. ***Pharmaceutical Biology***, 51(11): 1363-1371.

Moreno, M., Isla, N., Sampietro, A.R., Vattone, M.A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. ***Journal of Ethnopharcology***, 71: 109-114.

Mossine, V.V., Chopra, P., Mawhinney, T.P. 2008. Interaction of tomato lycopene and ketosamine against rat prostate tumorigenesis. ***Cancer Research***, 68(11): 4384-4391.

Murphy, M.P. 2013. Antioxidants as therapies: Can we improve on nature? ***Free Radical Biology and Medicine,*** 8: 20-23.

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (αTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. ***Food Chemistry***, 129: 139-148.

Nottingham University. 2015. The home of bacterial cell-cell communication on the web Hosted by the University of Nottingham quorum sensing research group, http://www.nottingham.ac.uk/quorum/fischeri.htm, 03.12.2015.

Oberley, T.D., Oberley, L.W. 1997. Antioxidant enzyme levels in cancer. ***Histology and Histopathology***, 12(2): 525-535.

Oboh, G., Ademosun, A.O., Margareth Akinleye, M., Omojokun, O.S., Boligon, A.A., Athayde, M.L. 2015. Starch composition, glycemic indices, phenolic constituents, and antioxidative and antidiabetic properties of some common tropical fruits. ***Journal of Ethnic Foods***, 2: 64-73.

Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T. 2003. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. ***Archives of Biochemistry and Biophysics,*** 417: 3-11.

Okumuş, V., Pirinç, V., Onay, A., Başaran, D. 2011. *In vitro* propagation of Diyarbakır watermelons and comparison of direct-seeded and transplanted watermelon. ***Turkish Journal of Biology***, 35: 601-610.

Oms-Oliu[a], G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. 2009. Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. ***Food Chemistry***, 115: 1312-1319.

Oms-Oliu[b], G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. 2009. Use of Weibull distribution for describing kinetics of antioxidant potential changes in fresh-cut watermelon. ***Journal of Food Engineering***, 95: 99-105.

Oruç, N. 2004. "Emet-Kütahya içme sularında arsenik düzeyi, önemi ve bor yatakları ile ilişkisi" II. Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. ***Japanese Journal of Nutrition***, 44: 307-315.

Pal, S., Chatterjee, A.K. 2004. Protective effect of methionine supplementation on arsenic-induced alteration of glucose homeostasis. ***Food and Chemical Toxicology***, 42(5): 737-742.

Pan, X., Dai, Y., Li, X., Niu, N., Li, W., Liu, F., Zhao, Y., Yu, Z. 2011. Inhibition of arsenic induced-rat liver injury by grape seed exact through suppression of NADPH oxidase and TGF-β/Smad activation. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 254: 323-331.

Paul, D.S., Hernandez-Zavala, A., Walton, F.S., Adair, B.M., Dedina, J., Matousek, T., Styblo, M. 2007. Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: Development of a mouse model for arsenic-induced diabetes. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 222: 305-314.

Perales, S., Delgado, M.M., Alegria, A., Barbera, R., Fare, R. 2005. Liquid chromatographic determination of vitamin D_3 in infant formulas and fortified milk. ***Analytica Chimica Acta***, 543: 58-63.

Perkins-Veazie, P., Collins, J.K. 2004. Flesh quality and lycopene stability of fresh-cut watermelon. ***Postharvest Biology and Technology***, 31: 159-166.

Perkins-Veazie, P., Collins, J.K., Pair, S.D., Roberts, W. 2001. Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 81: 983-987.

Perkins-Veazie, P., Ma, G., Dean, L., Hassell, R. 2015. Comparison of free citrulline and arginine in watermelon seeds and flesh. ***American Society for Horticultural Science***, August 4-7, New Orleans.

Perron, N.R., Brumaghim, J.L. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. ***Cell Biochemistry and Biophysics***, 53: 75-100.

Pham-Huy, L.A., Pham-Huy, H.H.C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. ***International Journal of Biomedical Science,*** 4(2): 89-96.

Pino, J.A., Marbot, R., Aguero, J. 2003. Volatile components of watermelon (*Citrillus lanatus* [Thumb.] Matsum. Et Nakai) fruit. ***Journal of Essential Oil Research***, 15: 379-380.

Pirinç, V., Onay, A. 2008. Diyarbakır karpuzunun (Sürme) *in vitro* regenerasyonunda eksplantın sürgün proliferasyonuna etkisi. ***Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi***, 12(1): 57-61.

Pirinç, V., Onay, A., Yıldırım, H., Adıyaman, F., Işıkalan, F., Başaran, D. 2003. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid Diyarbakır watermelon (*Citrullus lanatus* cv. ‘‘Sürme’’). ***Turkish Journal of Biology***, 27: 101-105.

Poduri, A., Rateri, D.L., Saha, S.K., Saha, S., Daugherty, A. 2013. *Citrullus lanatus* ‘sentinel’ (watermelon) extract reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, 24: 882-886.

Pokorny, J., Yanislhlieva, N., Gordon, M. (eds). Hall III C. 2001. Source of natural antioxidants: Oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. Antioxidants in Food, Practical Applications, pp. 169-219, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.

Pradosh, R., Saha, A. 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. ***Current Science***, 82: 38-45.

Prakash, P., Russel, R.M., Krinsky, N.I. 2001. *In vitro* inhibition of proliferation of estrogen dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids or retinoids. ***Nutrition and Cancer***, 131: 1574-1580.

Quek, S.Y., Chok, N.K., Swedlund, P. 2007. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. ***Chemical Engineering and Processing***, 46: 386-392.

Rahman, H., Priyanka, P., Lavanya, T., Srilakshmi, N., Kumar, P.R. 2013. A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Citrullus lanatus* L. ***International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences***, 3(2): 77-81.

Reznick, A.Z., Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. ***Methods in Enzymology***, 233: 357-363.

Rimando, A.M., Perkins-Veazie, P.M. 2005. Determination of citrulline in watermelon rind. ***Journal of Chromatography A***, 1078: 196-200.

Rodriguez, V.M., Jimenez-Capdeville, M.E., Giordano, M. 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. ***Toxicology Letters***, 145: 1-18.

Roe, N.D., Ren, J. 2012. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. ***Vascular Pharmacology,*** 57: 168-172.

Roginsky, V., Lissi, E.A. 2005. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. ***Food Chemistry***, 92: 235-254.

Roleira, F.M.F., Tavares-da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. ***Food Chemistry***, 183: 235-258.

Roy, P., Saha, A. 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. ***Current Science***, 82: 1-10.

Sabbağ, Ç., Sürücüoğlu, M.S. 2011. Likopen: insan sağlığında vazgeçilmez bir bileşen. ***Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi***, 6(3): 27-41.

Sahreen, S., Khan, M.R., Khan, R.A., 2011. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl_4-induced damage in rat. ***BMC Complementary and Alternative Medicine***, 11: 48.

Samuel, S., Kathirvel, R., Jayavelu, T., Chinnakkannu, P. 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-*α*-lipoic acid. ***Toxicology Letters***, 155: 27-34.

Saso, L., Firuzi, O. 2014. Pharmacological applications of antioxidants: Lights and shadows. ***Current Drug Targets***, 15: 1-23.

Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., Guzik, T.J. 2012. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. ***Vascular Pharmacology***, 56: 216-231.

Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J. 1982. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. ***Pathology Annual***, 17: 229-259.

Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I., Milner, J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, 18: 567-579.

Seifried, H.E., Anderson, D.E., Sorkin, B.C., Costello, R.B. 2004. Executive summary report. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, *134*: 3143-63.

Sen, S., De, B., Devanna, N., Chakraborty, R. 2013. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. ***Chinese Journal of Natural Medicines***, 11(2): 149-157.

Serdal Öğüt, S. 2014. Importance of natural antioxidants. ***Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty***, 11(1): 25-30.

Sheik Abdulazeez, S., Thiruvengadam, D. 2013. Effect of lycopene on oxidative stress induced during D-galactosamine/ lipopolysaccharide sensitized liver injury in rats. ***Pharmaceutical Biology***, 51(12): 1592-1599.

Sigma- Aldrich. 2015. Gallic acid. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/147915?lang=en&region=TR. 03.12.2015.

Singh, R., Singh, S., Kumar, S., Arora, S. 2007. Free radical-scavenging activity of acetone extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ***Food Chemistry***, 103: 1403-1410.

Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. ***American Journal of Enology and Viticulture***, 28: 49-55.

Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. ***Applied Geochemistry***, 17: 517-568.

Smith, A.H., Smith, M.M.H. 2004. Arsenic drinking water regulations in developing countries with extensive exposure. ***Toxicology***, 198: 39-44

Sonsuz, A. 2007. Karaciğer Fonksiyon Bozukluklarına Klinik Yaklaşım. ***İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri***, 58: 69-78. İstanbul.

Stadtman, E.R., Berlett, B.S. 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. ***Chemical Research in Toxicology***, 10: 485-494.

Stahl, W., Sies, H. 2012. β-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 96: 1179-1184.

Sun, F., Hamagawa, E., Tsutsui, C., Sakaguchi, N., Kakuta, Y., Tokumaru, S., Kojo, S. 2003. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by d-galactosamine in rat liver. ***Biochemical Pharmacology***, 65: 101-107.

Szatrowski, T.P., Nathan, C.F. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. ***Cancer Research,*** 51: 794-798.

Tan, C., Xue, J., Abbas, S., Feng, B., Zhang, X., Xia, S. 2014. Liposome as a delivery system for carotenoids: Comparative antioxidant activity of carotenoids as measured by ferric reducing antioxidant power, DPPH assay and lipid peroxidation. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 62(28): 6726-6735.

Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. ***Biomedicine and Pharmacotherapy***, 58: 100-110.

Teodoro, A.J., Oliveira, F.L., Martins, N.B., Maia, G.A., Martucci, R.B., Borojevic, R. 2012. Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. ***Cancer Cell International***, 12: 36.

Tlili, I., Hdidder, C., Lenucci, M.S., Riadh, I., Jebbari, H., Dalessandro, G. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus Ianatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area. ***Journal of Food Composition Analysis***, 24: 307-314.

Tseng, W.P. 1989. Blackfoot disease in Taiwan: A 30 year fellow-up study. ***Angiology***, 40(6): 547-558.

Tuveson, R.W., Larson, R.A., Kagan, J. 1988. Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules. ***Journal of Bacteriology***, 170: 4675-4680.

Türk Patent Enstitüsü. 2008.

Türkiye İstatistik Kurumu. 2013

Uchida, K., Stadtman, E.R. 1993. Covalent attachment of 4-hydroxy nonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase a possible involvement of intra and intermolecular cross-linking reaction. ***The Journal of Biological Chemistry***, 268: 6388-6393.

Ulukaya, E. Apoptozis ders notları. Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/ apoptozisdersnotu.pdf, Erişim tarihi: 01.12.2015.

Uppala, P.T., Dissmore, T., Lau, B.H.S., Andacht, T., Rajaram, S. 2013. Selective inhibition of cell proliferation by lycopene in MCF-7 breast cancer cells *in vitro*: A proteomic analysis. ***Phytotherapy Research***, 27: 595-601.

Valgimigli, L., Pratt, D.A. 2012. Antioxidants in chemistry and biology. In Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials; Chatgilialoglu, C., Studer, A., Eds.; Wiley, (3): 1623-1677, Chichester. UK.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. ***Chemico-Biological Interactions***, 160: 1-40.

Vijaya Kumar Reddy, C., Sreeramulu, D., Raghunath, M. 2010. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. ***Food Research International***, 43: 285-288.

Walton, F.S., Harmon, A.W., Paul, D.S., Drobna, Z., Patel, Y.M., Styblo, M. 2004. Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: Possible mechanism of arsenic-induced diabetes. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 198(3): 424-433.

Wikipedia. 2015. Gallic acid. https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid, 03.12.2015.

Wikipedia. 2015. Laboratory rat. https://en.wikipedia.org/wiki/Laboratory_rat#Wistar_rat, 03.12.2015

Wolfe-Simon, F., Blum, J.S., Kulp, T.R., Gordon, G.W., Hoeft, S.E., Pett-Ridge, J., Stolz, J.F., Webb, S.M., Weber, P.K., Davies, P.C.W., Anbar, A.D., Oremland, R.S. 2011. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. ***Science***, 332: 1163-1166.

Yadav, R.S., Sankhwar, M.L., Shukla, R.K., Chandra, R., Pant, A.B., Islam, F., Khanna, V.K. 2009. Attenuation of arsenic neurotoxicity by curcumin in rats. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 240(3): 367-376.

Yadav, R.S., Shukla, R.K., Sankhwar, M.L., Patel, D.K., Ansari, R.W., Pant, A.B., Islam, F., Khanna, V.K., 2010. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. ***NeuroToxicology***, 31: 533-539.

Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R., Okada, S. 1991. Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 108: 205-213.

Yang, C.M., Yen, Y.T., Huang, C.S., Hu, M.L. 2011. Growth inhibitory efficacy of lycopene and *beta*-carotene against androgen-independent prostate tumor cells xenografted in nude mice. ***Molecular Nutrition and Food Research***, 55(4): 606-612.

Yousef, M.I., El-Demerdash, F.M., Radwan, F.M.E. 2008. Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats: Ameliorating effect of curcumin. ***Food and Chemical Toxicology***, 46: 3506-3511.

Yu, J-Q., Lei, J-C., Zhang, X-Q., Yu, H-D., Tian, D-Z., Liao, Z-X., Zou, G-L. 2011. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus Turcz.* var. *hirtus* Regel. ***Food Chemistry***, 126: 1593-1598.

Zakharyan, R.A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S.M., Tsaprailis, G., Board, P.G., Liebler, D.C., Aposhian, H.V. 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. ***Chemical Research in Toxicology***, 14: 1051-1057.

Zamora, P.L., Rockenbauer, A., Villamena, F.A. 2014. Radical model of arsenic(III) toxicity: theoretical and EPR spin trapping studies. ***Chemical Research in Toxicology***, 27(5): 765-774.

Zhang, J., Xu, M. 2002. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. ***Trends in Cell Biology***, 12(2): 84-89.

Zhao, G.R., Xiang, Z.J., Ye, T.X., Yuan, Y.J., Guo, Z.X. 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax natoginseng*. ***Food Chemistry***, 99: 767-774.

Zhao, Y., Du, S., Wang, H., Cai, M. 2014. *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. ***Food Chemistry*** 152: 462-466.

EKLER

EK 1

Vitamin analizi için HPLC ayarları

Kolon : Macherey-Nagel, Nucleosil 120-5 C18, 250 x 4.6 mm

Dedektör : Lab Alliance Model 201 UV dedektör

Dalga boyu : 298 nm

Mobil faz : Metanol (%100)

Akış Hızı : 1 ml/dk

Sıcaklık : 25 ^{o}C

Enjeksiyon : 20 µl

EK 2

Şeker analizi için HPLC ayarları

Kolon : Supelco, Supelcosil LC-NH_2 5 µm, 250x4.6 mm

Dedektör : Schambeck SFD Gmbh, RI2000, Refractive index detector

Mobil faz : 25:75 Su:Asetonitril

Akış Hızı : 1 ml/dk

Sıcaklık : 25 ^{o}C

Enjeksiyon : 20 µl

EK 3

Mikrodalga çözünürleştirme sistemi sıcaklık tablosu

Step	**1**	**2**	**3**	**4**
T (ºC)	140	160	180	100
Time (min)[a]	5	5	2	5
Time (min)[b]	5	5	2	5

[a] İstenen sıcaklıkta bekleme süresi
[b] Ardışık iki sıcaklık arasındaki bekleme süresi

EK 4

ICP-OES cihazı çalıştırma koşulları

Parameter	
RF power (W)	1450
Plasma gas flow rate (l/min)	15
Auxiliary gas flow rate (l/min)	0.2
Nebulizer gas flow rate (l/min)	0.8
Sample flow rate (l/min)	1.5
View mode	Axial-Radial
Read	Peak area
Source equilibration time (s)	15
Read delay (s)	60
Replicates	3
Background correction	2-point (manual point correction)
Spray chamber	Scott type spray chamber
Nebulizer	Cross-Flow GemTip Nebulizer (HF resistant)
Detector	CCD
Purge gas	Nitrogen
Shear gas	Air
Gas	Argon
Analytical wavelengths (nm)	Cd 228.802, Cu 327.393, Ni 231.604, Zn 206.200 Mn 257.610, Pb 220.353, Ca 317.933, Se 196.026 Fe 238.204

EK 5

Protein Miktar Tayini Reaktifleri

Reaktif A (500 ml): 1 gr Na-K-tartarate 4 H_2O

50 gr $NaCO_3$

250 ml 1N NaOH (10 gr tartılıp 250 ml tamamlanır)

1 gr Na-K-tartarate.$4H_2O$ tartılıp 500 ml'lik balona koyulur, üzerine 50 gr $NaCO_3$ tartılıp ilave edilir, onun üzerine önce biraz su daha sonra 250 ml 1N NaOH çözeltisi ilave edilip üzeri distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. Karışımın içine bir magnet atılıp çözünene kadar karıştırılır.

Reaktif B (100 ml: 2 gr Na-K-Tartarate.$4H_2O$

1 gr $CuSO_4.5H_2O$

10 ml 1N NaOH (0.4 grNaOH tartılıp 10 ml'ye tamamlanır)

2 gr Na-K-Tartarate.$4H_2O$ tartılıp 100 ml'lik balona alınır, üzerine 1 gr $CuSO_4.5H_2O$ ilave edilir. Bu karışıma biraz su ilave edilip çözüldükten sonra 10 ml 1N NaOH ilave edilir ve 100 ml'ye tamamlanır.

Reaktif C (160 ml): 10 ml 2N-Folin-Ciocalteau reaktifi + 150 ml H_2O (taze hazırlanır).

EK 6

Diyarbakır Karpuzu Coğrafi İşaret Tescil Belgesi

T. C.
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

COĞRAFİ İŞARET TESCİL BELGESİ

Tescil No	: 111
Başvuru Tarihi	: 03.12.2007
Başvuru No	: C 2007/017
Yayın Tarihi	: 09.08.2008
Coğrafi İşaretin Türü	: Menşe Adı
Başvuru Sahibi	: Diyarbakır Valiliği
Başvuru Sahibinin Adresi	: Rızvanağa Cad. İçofis Diyarbakır
Ürünün Adı	: Karpuz
Coğrafi İşaret	: Diyarbakır Karpuzu
Kullanım Biçimi	: Markalama
Coğrafi Sınırları	: Genel olarak Dicle Nehri kıyısında bulunan köy ve ilçelerde üretilmektedir. Diyarbakır Merkezi; Erimli, Terzian, Dürümlü, Sivritepe, Güzel, Bağıvar, Yukarı Kılıçtaşı, Tepe, Develi, Kervanpınar, Yuvacık, Şüktürlü, Başaklı, Anbar, Göksu, Şahabar, Harbejan Köyleri, Bismil ve Çınar ilceleri.

Diğer bilgiler ektedir.

Teknik özellikleri ve denetim biçimi ekte verilen coğrafi işaret; 09.08.2008 tarih ve 26962 sayılı Resmi Gazetede ilan edilmiştir. 555 sayılı Coğrafi İşaretlerin Korunması Hakkındaki Kanun Hükmünde Kararname'nin 12 nci maddesi gereğince 03.12.2008 tarihinden geçerli olmak üzere tescil edilmiştir.

T.C.
Prof. Dr. [illegible]
Enstitü Başkanı

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

EK 7

Etik Kurul Kararı

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURULU
(DÜHADEK)

EFQM
Committed to excellence

ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ
12.06.2012	1	Doç. Dr. Göksel KIZIL

KARAR

"**Sodyum Arsenit Uygulanan Ratlarda Diyarbakır Karpuzu'nun koruyucu etkisinin ve Antioksidant Aktivitesinin Araştırılması.**" konulu ve **2012/26** protokol numaralı araştırma projesi Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup araştırmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr. M. Serdar KEMALOĞLU
Tıp Fak. Beyin Cer. AD
(BAŞKAN)

Prof.Dr. Ahmet ONAY
Fen Fak. Biyoloji AD
(Raportör)

Doç.Dr. Muzaffer TAŞ
Veteriner Fak. Döl. ve Suni Tohm. AD
(ÜYE)

Yrd.Doç.Dr. Savaş KAYA
Tıp Fak. İmmünoloji AD
(ÜYE)

Yrd.Doç.Dr. Abdurrahman ABAKAY
Tıp Fak. Göğüs Hast. AD
(ÜYE)

Doç.Dr. Sema ÇELENK
Diş Hek. Fak. Çocuk Diş Hek. AD
(ÜYE)

Yrd.Doç.Dr. Mehmet ÇOLAK
Diş Hek. Fak. Ağ.Diş Çene Rad. AD
(ÜYE)

Yrd.Doç.Dr. Ali İhsan DİKER
Veteriner Fak. Parazitoloji AD
(ÜYE)

Dicle Üni. Prof. Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM)
Tel: 0 412 248 83 31/4062, Fax: 2486431, E-Posta: dusam@dicle.edu.tr Web: www.dicle.edu.tr/merkez/saglmer

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sevcan ALTAŞ

Doğum Tarihi : 01.01.1978

Uyruğu : T.C. 12794036158

Doğum Yeri : Dicle/DİYARBAKIR

Medeni Hali : Bekar

Adres İş : Halk Sağlığı Laboratuvarı
Şehitlik 14. Sokak No:8 21010 Yenişehir /DİYARBAKIR

Ev : Huzur Evleri 68. Sokak
No: 28/3 21220 Kayapınar/DİYARBAKIR

e-mail : sevcan.altas@saglik.gov.tr
sevcanaltas@hotmail.com

İŞ BİLGİLERİ

Eylül 2012 - Halen	L1 Tipi Diyarbakır Halk Sağlığı Laboratuvar Sorumlusu
Eylül 2008 - Eylül 2012	Kimyager / Diyarbakır Halk Sağlığı Laboratuvarı
Haziran 2007 - Eylül 2008	Kimyager / Mardin Halk Sağlığı Laboratuvarı
Ekim 2001 - Haziran 2007	Hemşire / Diyarbakır Sağlık Müdürlüğü A.S.H. (112)
Ocak 1998 - Ekim 2001	Hemşire / Diyarbakır Kayapınar Sağlık Ocağı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Şubat 2011 - Mayıs 2012	İngiltere Leicester De Montfort Üniversitesi PhD (Erasmus Staj Hareketliliği Öğrencisi)
Mart 2011 - Haziran 2011	İngiltere Leicester De Montfort Üniversitesi PhD (misafir araştırmacı)
2009 - 2015	Diyarbakır Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD (Biyokimya) PhD
2006 - 2009	Diyarbakır Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD (Biyokimya) Master
2001 - 2005	Diyarbakır Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

1993 - 1997	Ankara Cebeci Atatürk Anadolu Sağlık Meslek Lisesi
1989 - 1993	Adana Ceyhan Anadolu Lisesi
1984 - 1989	Adana Ceyhan Ayşe Malaz İlkokulu

GÖREV ALDIĞI PROJELER

1. Alıç (*Crataegus monogyna*) bitkisinin su ekstraktının antioksidant aktivitesi, oksidatif DNA hasarı ve protein oksidasyonu üzerine etkisi (DÜBAP-14-FF-76), **Projede Araştırmacı**, Mart 2014- Mart 2017 (devam ediyor).
2. Diyarbakır karpuzunun *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktivitelerinin araştırılması, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (DÜBAP 13-FF-48), **Projede Araştırmacı**-Doktora Tezi, 2013 -Aralık 2015.
3. Sodyum arsenit uygulanan ratlarda Diyarbakır karpuzunun koruyucu etkisinin ve antioksidant aktivitesinin araştırılması (DÜBAP 2012/26), **Projede Araştırmacı**-Doktora Tezi, 2012-Aralık 2015.
4. Karbon tetraklorür (CCl_4) ile sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan oksidatif doku hasarı üzerine Diyarbakır Karpuzu'nun *in vivo* lipit peroksidasyonunu önleme etkisi ve immuno histokimyasal değerlendirme (DÜHADEK-2010/48), **Projede Araştırmacı,** 2010-2011.
5. *Cedrus libani* (Sedir) ve *Abies clicia* (Köknar) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması (DÜBAP-07-01-23), **Projede Araştırmacı**-Master Tezi, 2007-Ocak 2009.
6. Akraba Evlilikleriyle Geçme Oranı Artan ve Doğuştan Gelen Lösemi ve Kan Hastalıklarının Genetik Danışmanlık ve Eğitim Hizmetleriyle Azaltılması Projesi (Sağlık Bakanlığı-LÖSEV-AB), **Projede Araştırmacı**, 2005-2006.

MAKALELER

1. **S. Altaş**, G. Kızıl, M. Kızıl, A. Ketani, P. I. Haris "Protective effect of Diyarbakır watermelon juice on carbon tetrachloride-induced toxicity in rats" *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2433-2438 (2011).
2. S. Emen Tanrıkut, B. Çeken, **S. Altaş**, M. Pirinççioğlu, G. Kızıl, M. Kızıl, "DNA cleavage protecting activity and *in vitro* antioxidant potential of aqueous extract from fresh stems of *Rheum ribes*" *Acta Alimentaria*, 42(3), 461-472 (2013).
3. M. Akdag, S. Dasdag, U. Alabalık, B. Yılmaz, **S. Altas**, S. B. Zincircioglu, A. Gül, I. Kaplan, F. Meric, "Does Short Term Usage of Fresh Pomegranate Juice (FPJ) Protect Cochlear Hair Cells after Cisplatin Based Chemo-Irradiation?" *International Advanced Otology*, 10(2), 128-133 (2014).

ULUSLARARASI BİLDİRİLER

1. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Kızıl, M., "Antioxidant and Anticancer Activities of Watermelon Juice″ International Workshop on" Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Oxidative Stress, Rome, July 2-4, 2015.
2. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Haris, P. I., Kızıl, M., Emen Tanrıkut, S., "Diyarbakır Karpuzunun Likopen, Element, Vitamin ve Şeker İçeriğinin Araştırılması – Determination of Lycopene, Element, Vitamin and Sugar Content of Diyarbakır Watermelon" International Mesopotamia Agriculture Congress, Diyarbakır, Turkey, 22-25 September, 2014.
3. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Haris, P. I., Kızıl, M., "The lycopene content and anticancer activity of Diyarbakır watermelon" 5th International Congress on Nutrition and Cancer, PP-004, Elazığ, Turkey, 09-11 September, 2012.
4. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Kızıl, M., "Antioxidant Activities of Watermelon Juice" 1st International Symposium on Secondary Metabolites, Chemical, Biological and Biotechnological Properties, P-103, Denizli, Turkey, 12-15 September, 2011.
5. **Altaş, S.**, Yavuz, M., Aytekin, Ç., "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanol Extracts and Fractions of *Cedrus libani Resin*" International Symposium on Drug Research and Development, Ankara, May 4-7, 2009.

ULUSAL BİLDİRİLER

1. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Kızıl, M., Haris, P.I., "Diyarbakır Karpuzu'nun Protein Oksidasyonu Üzerine Koruma Etkisinin Araştırılması" 27. Ulusal Kimya Kongresi, P4025, Çanakkale, 23-28 Ağustos 2015.
2. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Kızıl, M., "Diyarbakır Karpuzu'nun Radikal Söndürme Aktivitesinin Araştırılması" 27. Ulusal Kimya Kongresi, P4020, Çanakkale, 23-28 Ağustos 2015.
3. Dinç, H., Çeken Toptancı, B., **Altaş, S.**, Emen Tanrıkut, S., İnceören, N., Kızıl, G., Kızıl, M., "Crataegus monogyna (Alıç)' ın Antioxidant Aktivitesi ve Oksidatif DNA Hasarı Koruyucu Etkisi" 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, P504, Antalya, 20-22 Mart 2015.
4. Emen, S., Kızıl, M., Kızıl, G., **Altaş, S.**, "*Achillea millefolium* Bitkisinin Antioksidant, Radikal Söndürücü ve Protein Oksidasyonunu Önleme Aktivitesinin Araştırılması" 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, P505, Antalya, 21-23 Mart 2014.
5. Çeken, B., **Altaş, S.**, Kızıl, G., Kızıl, M., "Meyan Kökünün Antioksidant Aktivitesi ve Biyomolekülleri Koruyucu Etkisi" IV. Multidisipliner Kanser Kongresi, P15, Bursa, 13-16 Aralık 2012.
6. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Haris, P.I., Kızıl, M., "Diyarbakır Karpuz Suyunun Bazı Kanser Hücreleri Üzerine Etkisi" IV. Multidisipliner Kanser Kongresi, P75, Bursa, 13-16 Aralık 2012.

7. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Harıs, P.I., Kızıl, M., "Diyarbakır Karpuzu'nun Likopen ve Element İçeriği (Lycopene and Element Contents of Diyarbakır Watermelon)" 26. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), BP-TR-034, Muğla, 01. 10. 2012-06. 10. 2012.

8. **Altaş, S.**, Kızıl, G., Kızıl, M., "Diyarbakır Karpuz Suyunun Antioksidant Aktivite, Element, Şeker ve Vitamin İçeriğinin Araştırılması" 25. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), BP-153, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.

9. Erdem, P., **Altaş, S.**, Emen Tanrıkut S., Kızıl, M., Yurdakoç, M., "Fe(III)-Tanen Kompleksinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antioksidant-Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi" 25. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), IP-112, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.

10. **Altaş, S.,** Yavuz, M., Aytekin, M.Ç., "*Abies cilicia* Reçinesinin Metanol Eksraktı ve Bunun Fraksiyonlarının Antioksidant ve Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması" 24. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Zonguldak, 29 Haziran-2 Temmuz 2010.

11. Emen, S., Çeken, B., **Altaş, S.**, Pirinççioğlu, M., Kızıl, M., "*Rheum ribes* Bitkisinin Su Ekstraktının Antioksidant ve DNA'yı Serbest Radikallerden Koruma Etkisinin Araştırılması" 24. Ulusal Kimya Kongresi, BP 102, Zonguldak, 29 Haziran-2 Temmuz 2010.

12. Toker, Z., Kızıl, G., **Altaş, S.**, "Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen Bazı Salvi Türlerinin Uçucu Yağlarının Antioksidant Etkilerinin Araştırılması" 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, Türkiye, 23-27 Haziran 2008.

Uluslararası Dergilerde Hakemlik ve Editörlük:

Pharmaceutical Biology (2 kez, 2012/2014)

L. Atıflar ve h-index:

Atıflar: Web of Science'ta tarama sonucu Uluslararası hakemli dergilerde (SCI Expanded kapsamında) yayınlanan **1 makaleye** toplam olarak **15 adet** atıf almıştır. (02.12.2015 tarih itibari ile)