



Yıl/Year: 2016

Cilt/Volume: 5

Sayı/Number: 1

TÜRK DOĞA VE FEN DERGİSİ

Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
tarafından yayımlanmaktadır

Published by Institute of Science of Bingöl
University

*TURKISH JOURNAL
OF NATURE AND
SCIENCE*

ISSN: 2149-6366

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



TÜRK DOĞA VE FEN

DERGİSİ

Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından yayımlanmaktadır

Published by Institute of Science of Bingol University

Turkish Journal of Nature and Science



Türk Doğa ve Fen Dergisi
Turkish Journal of Nature and Science

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Adına Sahibi
Owner on behalf of Institute of Science of Bingöl University

Doç. Dr. İbrahim Yasin ERDOĞAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Director of Institute of Science

Editör/Editor

Yrd. Doç. Dr. Özgür ÖZGÜN

Yazışma Adresi/Correspondence Adress

Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
12000 Bingöl
Tel/Phone: +90 (426) 215 00 72
Faks/Fax: +90 (426) 216 00 34

Yayın Türü/Publication Type

Bilimsel Dergi
Scientific Journal

YAYIN KURULU/EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Abdurrahman GÜL
Prof. Dr. Alaaddin YÜKSEL
Prof. Dr. Erkan BOYDAK
Prof. Dr. Fahrettin YAKUPHANOĞLU
Prof. Dr. Fehim FINDIK
Prof. Dr. Hamit Özkan GÜLSOY
Prof. Dr. İbrahim TÜRKOĞLU
Prof. Dr. İskender DEMİRKOL
Prof. Dr. Latif KELEBEKLİ
Prof. Dr. Lütfi BEHÇET
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ
Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU
Prof. Dr. Turgay ŞENGÜL
Doç. Dr. Abdullah MART
Doç. Dr. Ali Rıza DEMİRKIRAN
Doç. Dr. Asım KAYGUSUZ
Doç. Dr. Hasan KILIÇ
Doç. Dr. Hüseyin VAPUR
Doç. Dr. İbrahim Yasin ERDOĞAN
Doç. Dr. İlkey ŞİŞMAN
Doç. Dr. Kağan KÖKTEN
Doç. Dr. Murat SOYLU
Doç. Dr. Mustafa KOYUN
Doç. Dr. Nezir YILDIRIM
Doç. Dr. Orhan YILMAZ

Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Fırat Üniversitesi
Sakarya Üniversitesi
Marmara Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Ordu Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
İnönü Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Sakarya Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Bingöl Üniversitesi
Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Doç. Dr. Ramazan MERAL	Bingöl Üniversitesi
Doç. Dr. Ramazan SOLMAZ	Bingöl Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Dursun ÖZTÜRK	Bingöl Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Halil ŞİMŞEK	Bingöl Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Mücahit PAKSOY	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Ömer AKGÖBEK	Harran Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Özgür ÖZGÜN	Bingöl Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Tahir AKGÜL	Sakarya Üniversitesi

TEŞEKKÜR/ACKNOWLEDGEMENT

Bu sayıda yer alan çalışmaların yazarlarına ve değerli zamanlarını ayırarak görüş ve önerileri ile katkıda bulunan hakemlerimize teşekkür eder, saygılar sunarız.



Türk Doğa ve Fen Dergisi
Turkish Journal of Nature and Science

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



İÇİNDEKİLER/CONTENTS

Elektrokimyasal depozisyon yöntemi ile güneş enerjisi uygulamaları için nanomalzemelerin geliştirilmesi İbrahim Y. Erdoğan, Şamil Demirkol	1
Kadmiyum Uygulanan Ratlarda Lipit Peroksidasyon Üzerine Bal ve Polenin Antioksidan Etkileri Halil Şimşek, Mehtap Özçelik, Osman Güler, Fulya Benzer, Mehmet Çay, Mesut Aksakal	6
<i>Astragalus gummifer</i> Çiçeklerinin Etanol Özüünün PC-3 ve HUVECs Üzerindeki Biyolojik Aktivitesi Ekrem Darendelioğlu, Musa Tartık, Gürkan Aykutoğlu, Gıyasettin Baydaş	12
Inhibitory Effects of Two Kinds Snake Venom on Sheep Liver Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase and Glutathione Reductase Enzymes Activities Mustafa Erat, Mehmet Ciftci, Akcahan Gepdiremen, Tavakkul Iskenderov	19
Aşırı Öğrenme Makineleri ile Gürültülü EKG Sinyallerinin Sınıflandırılması Mehmet Üstündağ, Ömer Faruk Alçın, Ahmet Güner	24
An experimental investigation of effect of turning AISI 1040 steel at low cutting speed on tool wear and surface roughness steel Ali Erçetin, Üsame Ali Usca	29
Hidrofobik bitki ekstraktının kapsüle edilmesi için nanopartikül sisteminin hazırlanması ve fizikokimyasal, biyolojik özelliklerinin belirlenmesi Bülent Kaya, Uğur Taşkın	37
Bazı Domates (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) çeşitlerinde, farklı NaCl konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi ve ortalama çimlenme süresi üzerine etkileri Mehmet Yaman, Ertan Yıldırım, Seda Belen, Cüneyt Bostancı	47
Yerel ekmeçlik buğday populasyonundan seçilmiş saf hatlarda bazı özelliklerarası ilişkilerin belirlenmesi Hasan Kılıç, Mevlüt Akçura, Rıdvan Uçar, Hüsnü Aktaş, Kağan Kökten, Sertaç Tekdal	52
Screening of in vitro antibacterial activities of methanol extracts of endemic <i>Bunium brachyactis</i> Barış Enez, Sema Ağuloğlu Fincan, Hülya Hoşgören	60
Assessment of shear walls effectiveness in controlling lateral drift for 10 stories reinforced concrete building Mehrzaad Mohabbi Yadollahi, Ahmet Benli	64
İşlenmiş ve işlenmemiş tarımsal toprakların karbon stoklarının karşılaştırılması: Bir Nusaybin örneği İlhan Zan, Erdal Sakin	68
Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) erythrocytes Pınar Guller, Aysegül Bayındır, Orhan Erdoğan, Mehmet Ciftci	73
Sığırlarda Ana Yaşının Süt Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkisi Tolga İnal, Murat Çimen	79
Kurşun Uygulanan Ratlarda Lipit Peroksidasyon Üzerine Çörek Otu Tohumunun Antioksidan Etkileri Osman Güler, Halil Şimşek, Mehtap Özçelik, Fulya Benzer, İzzet Karahan, Sezayi Kaplan	82



Elektrokimyasal depozisyon yöntemi ile güneş enerjisi uygulamaları için nanomalzemelerin geliştirilmesi

İbrahim Y. Erdoğan*, Şamil Demirkol

Özet

Bu çalışmada, Cu_2O nano yapıları, yüzey sınırlı reaksiyonlara dayanan elektrokimyasal depozisyon tekniğinden yararlanılarak hazırlandı. UPD bölgesinde hazırlanan Cu_2O nano yapıları, aynı şartlar altında bulk depozisyon bölgesinde hazırlanan Cu_2O depozitleri ile karşılaştırıldı. Bulk depozisyon bölgesindeki 3 boyutlu büyüme kinetiğinin aksine, UPD bölgesinde 2 boyutlu bir büyüme kinetiği söz konusudur. Cu_2O yarıiletkeni, tüm bazik pH'larda elektrokimyasal olarak hazırlanmaya çalışıldı. Bu pH değerleri içinde, Cu_2O yarıiletkenini elektrokimyasal olarak hazırlamak için en ideal pH değeri belirlenmeye çalışıldı. Elektrodepozisyon çözeltisinin pH'sının bir fonksiyonu olarak nano yapıların boyutlarının değişimi incelendi. Çözeltilerin pH değerleri arttığında, elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu_2O nano yapıların boyutları azaldı. SEM görüntüleri UPD bölgesinde elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu_2O 'in mükemmel tek tip nanoküp şeklinde yapılarla elde edilebileceğini gösterdi. Cu_2O nano yapılarının kalitatif ve kantitatif analizleri, yapıda sadece Cu ve O bulunduğunu ve stokiyo metrinin 2/1 (Cu/O) oranına sahip olduğunu gösterdi. Elektrokimyasal olarak hazırlanan bakır (I) oksit yapılarına ait bant aralığı enerjisi 2,09 eV'tur. Bu çalışmada elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu_2O yarıiletkeni, güneş enerjisi uygulamalarında ideal bir soğurucu tabaka olarak kullanılmak üzere önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Cu_2O ; nano yapılar; nanoküpler; elektrodepozisyon; pH etkisi

The development of nanomaterials for the solar energy application via electrochemical deposition method

Abstract

In this work, Cu_2O nanostructures were prepared by the electrochemical deposition method based on surface-limited reactions. Cu_2O nanostructures prepared in UPD region were compared with Cu_2O deposits prepared in bulk deposition region under the same conditions. In contrast to 3D growth kinetics in bulk deposition region, there are 2D growth kinetics in UPD region. Electrochemical preparation of Cu_2O semiconductor in all basic pH was attempted. In these pH values, it was tried to determine the most ideal pH value to electrochemically prepare of Cu_2O semiconductor. Changes in the size of nanostructures as a function of pH of the electrodeposition solution were investigated. When pH values of the solutions were increased, the sizes of Cu_2O nanostructures prepared by electrochemical deposition were decreased. SEM images showed that Cu_2O prepared by electrochemically in UPD region can be obtained with structures shaped like perfect single type nanocube. The qualitative and quantitative analysis of Cu_2O nanostructures indicated that the structure have only Cu and O and stoichiometry have 2/1 (Cu/O) ratio. The band gap energy of the structures of copper (I) oxide prepared electrochemically is 2.09 eV. In this study, Cu_2O semiconductor prepared electrochemically may be recommended to be used as an ideal absorber layer in the solar energy application.

Keywords: Cu_2O ; nanostructures; nanocubes; electrodeposition; pH effect

1. Giriş

1990'lı yıllara kadar Cu_2O ile ilgili çok az sayıda bilimsel araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar, daha ziyade Cu_2O 'in çoklu ve tek kristallerinin büyütülmesi, bant aralığının ölçülmesi, elektriksel özelliklerinin incelenmesi, oksijen basıncının iletkenlik ve iletkenlik tipi üzerindeki etkisi, tuzakların ve tuzak cinslerinin belirlenmesi, bazı

optik özelliklerinin ve parametrelerinin tayini ve bazı metal/ Cu_2O /metal diyot uygulamalarıyla sınırlı kalmıştır. 1900'lı yıllardan sonra ilk ve tek yarıiletken diyot Cu_2O 'ten yapılabiliyordu ve bu elektronik cihazlarda kullanılabilen tek yarıiletken diyottu [1]. 1980'li yıllarda, Cu_2O 'in önemli bir foto-hafıza özelliği gösterdiğinin belirlenmesi, bu özelliğinin insan beyni ile ilişkisinin kanıtlanması, metal/ Cu_2O /metal yapılarında belirlenen anahtarlama ve fotovoltaiik özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra, Cu_2O 'in süper iletken malzemeler içerisine

yerleştirilmesiyle süper iletken malzemelerin iletkenliklerinin önemli ölçüde arttığı belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır [2].

Yarıiletkenlerin hazırlanmasında kullanılan elektrodepozisyon tekniği ile verimli sonuçlar alınmaktadır [3-6]. Bu teknikte filmi oluşturan elementleri içeren tek bir çözüldüden metalin bulk depozisyon bölgesinde sabit bir potansiyelde, tek adımda depozisyon yapılır. Elektrodepozisyon tekniğinden yararlanarak günümüzde BP Solar şirketi, CdTe tabanlı fotovoltaik hücreler üretmektedir. Elektrodepozisyonda metal konsantrasyonuna karşın ametallik konsantrasyonu çok düşük tutularak depozisyonun ilk aşamalarında yüzeyde bileşik oluşumu sağlanır [7,8].

Bakır oksit birçok yöntem ile hazırlanmıştır [9-11]. Bu çalışmada Cu_2O , tabaka tabaka depozisyonu mümkün kılan potansiyel altı depozisyon (UPD) bölgesi de dikkate alınarak elektrokimyasal olarak hazırlandı. İki boyutlu, atomik kontrollü büyümeyi mümkün kılan UPD temelli elektrodepozisyon tekniği ile nano yapıları yüksek kalitede hazırlanabilir. Bileşik yarıiletkenlerin sentezinde alternatif bir elektrodepozisyon yöntemi olarak, malzemeyi oluşturan bileşenleri içeren çözüldüden, metalin veya her iki türün UPD potansiyelinde depozisyon yapılırsa bahsedilen dezavantajların hiç biri söz konusu olmayacak ve elde edilen malzemeler de yüksek kalitede olacaktır. Bu düşünce doğrultusunda Demir ve grubu tarafından geliştirilen UPD temeline dayanan ko-depozisyon tekniği sayesinde, çok kaliteli bileşik yarıiletken ince filmler sentezlenmektedir [12]. Aynı çözüldüde bulunan iyonların her ikisinin de elementel hale geçeceği UPD potansiyelinde potansiyel kontrollü depozisyon yapıldığında, her bir elementin atomik tabakaları yerine her bir elementin atomları birbirine eşleşerek bileşik oluştururlar. Çünkü uygulanan UPD potansiyeli gereği aynı elementin atomunun üstüne tekrar aynı elementin atomu gelmeyecektir. Bu proses, depozisyon süresi ile öngörülen kalınlığa kadar devam ettirilebilir. Bu teknikten yararlanılarak ZnS [13], CdS [14], PbTe [15], Sb_2Te_3 [16], BiSbTe [17], Bi_2Te_3 [18] bileşik yarıiletkenleri oldukça yüksek kaliteli yapılarla sentezlenmiştir.

Bu çalışmada, Cu_2O nanoyapılarını hazırlayabilmek için öncelikle yarıiletkenin elektrodepozisyonu öncesi uygun şartlar, çözüldü davranışları ve konsantrasyonlar belirlendi. Daha sonra yarıiletkenin bünyesinde bulunan her bir bileşen için elektrokimyasal şartlar incelendi. Bunun için öncelikle dönüşümlü voltametri tekniğinden yararlanılarak bakırın UPD bölgesi belirlendi. Bu belirlenen UPD'ye uygun potansiyel bölgelerinde seçilen bir potansiyel değerinde potansiyel kontrollü elektroliz tekniğiyle Cu_2O bileşik yarıiletkenin depozisyonu gerçekleştirildi. Cu_2O yarıiletkeni, tüm bazik pH'larda elektrokimyasal olarak hazırlanmaya çalışıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda belirgin olarak Cu_2O 'in pH'sı 8 ile 10 arasında olan bazik sulu ortamlarda elektrokimyasal olarak hazırlanabileceği görüldü. Cu_2O nanoyapılarının kalitatif ve kantitatif analizleri, EDS, morfolojileri SEM, optik özellikleri UV-GB-NIR spektroskopisi teknikleri ile incelendi.

2. Materyal ve metod

Bu çalışmada saf Cu_2O nano yapıları yarıiletkenleri potansiyostat/galvanostat sistemiyle hazırlandı. Bunun için çalışma, karşıt ve referans elektrottan oluşan 3 elektrotlu hücre dizayn edildi. Çalışma elektrotu olarak ITO (indiyum kalay oksit) kaplı cam, referans elektrot olarak doygun kalomel (Hg/Hg_2Cl_2) elektrot ve karşıt elektrot olarak Pt tel elektrot kullanıldı. Çözüldü olarak de-iyonize saf su, bakır kaynağı olarak $CuSO_4$, elektrolit olarak Na_2SO_4 , kompleksleştirici olarak laktik asit ve ortamın pH'sını ayarlamak için NaOH kullanıldı. Elektrokimyasal çalışmalarımızda CH Instruments Electrochemical

Workstation marka/model potansiyostat/galvanostat kullanıldı. Malzemelerin morfolojilerinin ve nicel/nitel analizlerinin yapılmasında JEOL-JSM 6510 marka/model SEM/EDS sistemi kullanıldı. Hazırlanan yarıiletkenin optik özelliklerinin belirlenmesinde Shimadzu-UV-3600 marka/model spektrofotometre kullanıldı.

3. Bulgular ve tartışma

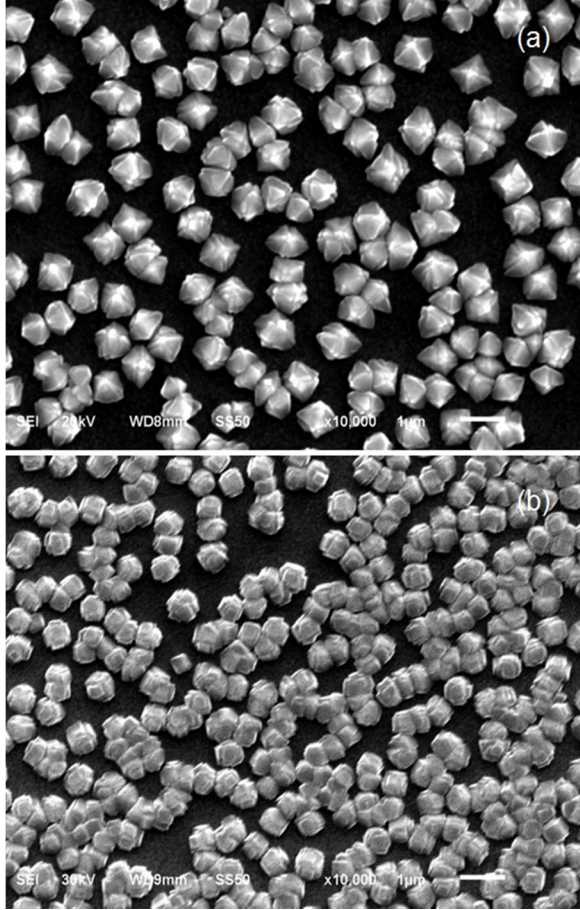
Literatürde Cu_2O yarıiletkeninin elektrokimyasal olarak hazırlanması üzerine çalışmalar mevcuttur. Ancak, bu çalışmalarda Cu_2O elektrodepozisyonu, yüzey sınırlı reaksiyonların göz önüne alınmadığı, bulk depozisyon bölgelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, bileşik yarıiletken Cu_2O nanoyapıları, yüzey sınırlı reaksiyonları bünyesinde barındıran, UPD temeline dayanan elektrokimyasal depozisyon tekniğinden yararlanılarak hazırlandı. Bulk depozisyon bölgesindeki 3 boyutlu büyüme kinetiğinin aksine, UPD bölgesinde 2 boyutlu büyüme kinetiği söz konusudur. Bunun sonucu olarak, bulk depozisyon bölgesinde düzensiz, rastgele ve yığın halde malzemeler üretilebilirken, UPD bölgesinde tabaka-tabaka, atomik seviye kontrollü olarak daha düzenli malzemeler üretilebilmektedir.

Cu_2O nanoyapıları, $CuSO_4$, Na_2SO_4 , laktik asit ve NaOH içeren bazik sulu ortamdan, bakırın UPD bölgesine uygun depozisyon potansiyelinde, potansiyel kontrollü depozisyon yöntemiyle hazırlandı. Bakırın bazik ortamda alınan dönüşümlü voltamogramları, elektrokimyasal olarak Cu_2O nanoyapılarını hazırlamak için yaklaşık depozisyon potansiyellerini belirlemek için kullanıldı. Bazik ortamda bakır, kararsızdır ve hidroksiti halinde çöker. Bazik ortamda bakırın kararlı halde tutulabilmesi için uygun bir kompleksleştirici (ligand) yardımıyla kompleks haline getirilmesi gerekir. Bazik ortamda yapılan çalışmalar, bakırın laktik asit ile sulu bazik ortamda kararlı halde tutulabileceğini gösterdi. Bakır, bazik ortamda kararlılık sabiti oldukça yüksek kompleksler oluşturur ve bu durum yüksek kaliteye sahip Cu_2O 'in bazik ortamdan elektrokimyasal olarak hazırlanmasını olanaklı kılar. Burada, stokiometrik, homojen, tek faza sahip Cu_2O nanoküpleri UPD temeline dayanan elektrokimyasal depozisyon tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde hazırlandı.

Cu_2O 'in elektrodepozisyonu bazik ortamda gerçekleştirilebilir. Cu_2O yarıiletkeni, $CuSO_4$, Na_2SO_4 ve laktik asit içeren sulu ortamda, tüm bazik pH'larda elektrokimyasal olarak hazırlanmaya çalışıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda belirgin olarak Cu_2O 'in pH'sı 8 ile 10 arasında olan bazik sulu ortamlarda elektrokimyasal olarak hazırlanabileceği görüldü. Çözüldülerin pH ayarlamasında NaOH kullanılmıştır. Malzemelerin elektrokimyasal olarak hazırlanmasında kullanılan kimyasalların en uygun konsantrasyonları belirlenmeye çalışıldı. Cu_2O yarıiletkenini elektrokimyasal olarak hazırlamak için birçok konsantrasyon denenerek, en ideal konsantrasyonların $CuSO_4$ için 20 mM, Na_2SO_4 için 0,2 M ve laktik asit için 0,3 M olduğu belirlendi.

Cu_2O 'in pH'sı 8 ile 10 arasında olan bazik sulu ortamlarda elektrokimyasal olarak hazırlanabileceği belirlendikten sonra, Cu_2O yarıiletkenini elektrokimyasal olarak hazırlamak için en ideal pH değeri belirlenmeye çalışıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda, çeşitli karakterizasyon teknikleri eşliğinde en ideal Cu_2O 'in pH'ı 9,65 olan bazik sulu çözüldülerden hazırlanabildiği görüldü. Elektrokimyasal olarak Cu_2O nanoyapılarını hazırlamak için depozisyon süresi 15 dakika ile sınırlı tutuldu. Değişik pH'lara sahip bazik çözüldü içinde, ITO kaplı cam elektrot üzerinde bakırın UPD ve bulk bölgeleri belirlendi. Depozisyon çözüldülerinin pH'ı 10'dan 8'e doğru gittikçe

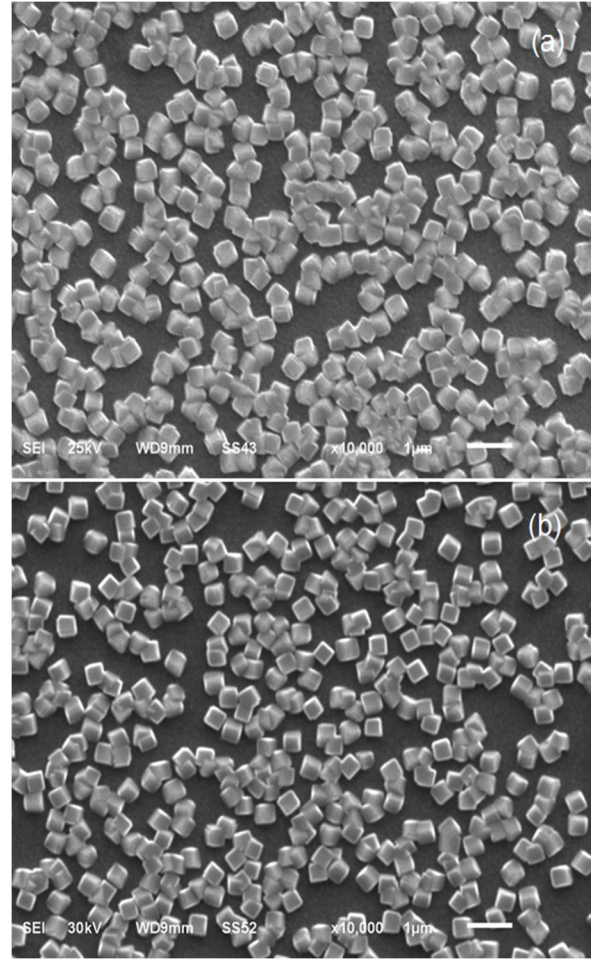
yaklaşık 50 mV pozitif bölgeye kaydı. pH:10 için -200 mV'tan, pH:8 için -150 mV'tan daha pozitif potansiyellerde, bakırın UPD'si gerçekleşeceği için depozit edilen bir türün üzerine aynı tür depozit olmaz. Dolayısıyla bu potansiyel bölgesinde homojen ve epitaksiyel bir yapı oluşacaktır. Eğer çalışma elektrotunun potansiyeli, bulk depozisyon başlangıç potansiyeli olan pH:10 için -200 mV'tan, pH:8 için -150 mV'tan daha pozitif bir potansiyel değerinde sabit tutulursa Cu ve O, ITO kaplı cam elektrot yüzeyinde tabaka-tabaka atomik düzende büyüyecektir.



Şekil 1.a. pH'sı 8, **b.** pH'sı 8,35 olan bazik sulu ortamda ITO kaplı cam substratlar üzerinde elektrokimyasal olarak büyütülen Cu₂O nanoparalarının SEM görüntüleri

UPD bölgesinde bakır ve oksijen atomları, Cu₂O bileşik yarıiletkenini oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu durum bazik şartlarda substrat yüzeyinde Cu₂O'nin elektrokimyasal olarak atomik düzende iki boyutlu bir büyüme kinetiğiyle büyüdüğünü ifade eder. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, en ideal Cu₂O'nin pH'ı 9,65 olan bazik sulu çözeltilerden hazırlanabildiği görüldüğü için, bu çalışma kapsamında daha çok pH değeri 9,65 olan sulu çözeltilerden UPD bölgesinde hazırlanan nanoparalar üzerine yoğunlaşmıştır.

pH'sı 8 olan bazik sulu çözeltiden ITO kaplı cam substrat yüzeyine depozit edilen Cu₂O nanoparalarının SEM görüntüsü Şekil 1.a'da verilmiştir. Burada, yaklaşık 600 nm genişliğe sahip nanokristallerin homojen olarak ITO kaplı cam yüzeyine dağıldığı görülür. Şekil 1.b, pH'sı 8,35 olan bazik çözeltiden ITO kaplı cam yüzeyinde Cu₂O elektrodepozisyonu sonucu hazırlanan nanoparaların morfolojisini gösteren SEM görüntüsüdür. Artan pH değeri ile birlikte boyutları küçülen, şekilleri farklılaşan ve sayıları artan, ortalama 500 nm çapa sahip nanoparaların homojen olarak ITO kaplı cam yüzeyine dağıldığı gözlenmektedir.

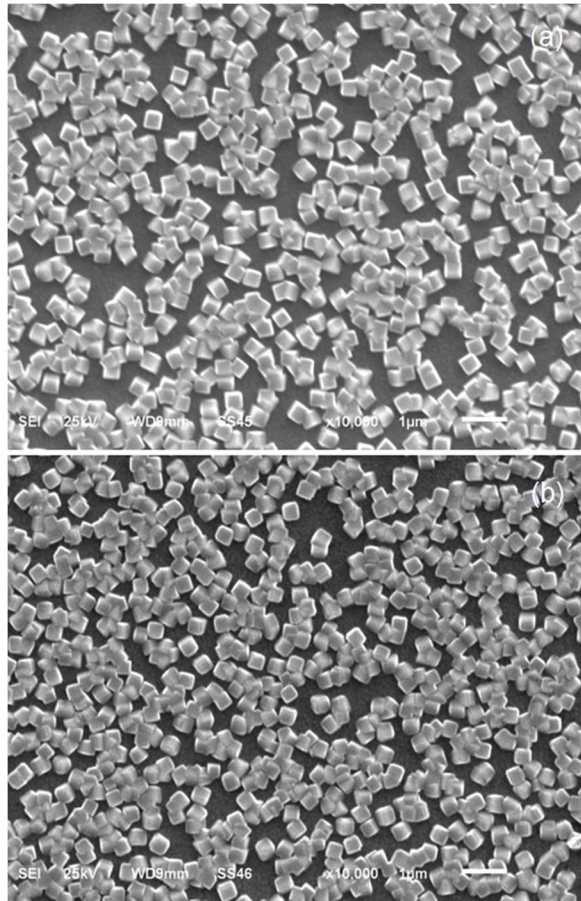


Şekil 2.a. pH'sı 8,65, **b.** pH'sı 9 olan bazik sulu ortamda ITO kaplı cam substratlar üzerinde elektrokimyasal olarak büyütülen Cu₂O nanoparalarının SEM görüntüleri

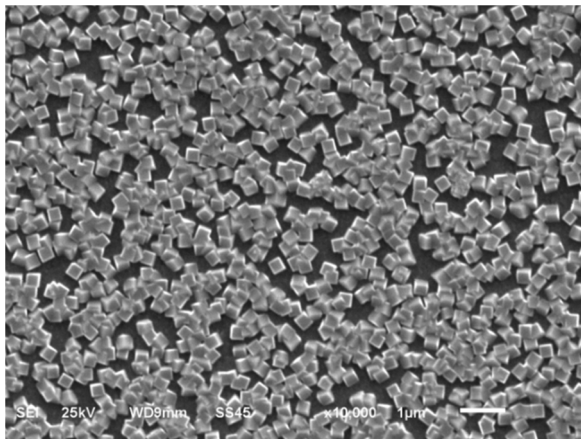
Şekil 2'deki SEM görüntüleri, artan pH ile birlikte malzemelerin ihtiva ettiği kristal boyutunun azaldığını ifade eder. pH'sı 8,65 ve 9 olan bazik sulu çözeltilerden elektrodepozit edilen Cu₂O nanoparalarına ait SEM görüntüleri kübik biçimli nanokristallerin boyutlarının pH'sı 8,65 olan bazik sulu ortamdan hazırlananlar için ortalama 400 nm (Şekil 2.a), pH'sı 9 olan bazik sulu ortamdan hazırlananlar için ortalama 350 nm olduğunu gösterir (Şekil 2.b).

pH'sı 9,35 olan bazik sulu çözeltiden ITO kaplı cam substrat yüzeyine depozit edilen Cu₂O nanoparalarının SEM görüntüsü Şekil 3.a'da verilmiştir. Burada, yaklaşık 300 nm genişliğe sahip nanoküplerin homojen olarak ITO kaplı cam yüzeyine dağıldığı görülür. Artan pH ile birlikte nanoparaların boyutları da azalmaktadır. Şekil 3.b, pH'sı 9,65 olan bazik çözeltiden Cu₂O elektrodepozisyonu sonucu hazırlanan nanoküplerin morfolojisini gösteren SEM görüntüsüdür. Artan pH değeri ile birlikte boyutları küçülen ve sayıları artan, ortalama 250 nm çapa sahip Cu₂O nanoküplerinin homojen olarak ITO kaplı cam yüzeyine dağıldığı gözlenmektedir.

Şekil 4'deki SEM görüntüleri, artan pH değeri ile birlikte Cu₂O'nin ihtiva ettiği kristal boyutunun daha da azaldığını açık olarak göstermektedir. Elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu₂O nanoparalarına ait SEM görüntüleri kübik biçimli nanokristallerin boyutlarının ortalama 200 nm olduğunu gösterir. Artan pH ile birlikte nanoparaların boyutları azalırken, sayıları artmıştır.



Şekil 3.a. pH'sı 9,35, **b.** pH'sı 9,65 olan bazik sulu ortamda elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu₂O nanoküplerinin SEM görüntüleri

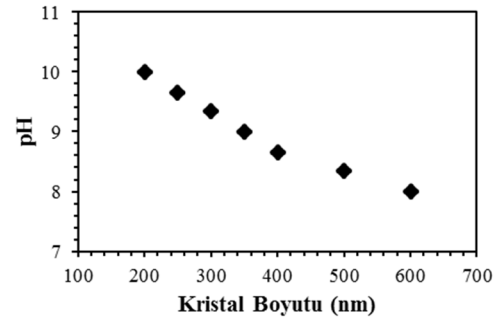


Şekil 4. pH'sı 10 olan bazik sulu ortamda elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu₂O nanoyapılarının SEM görüntüsü

Elektrodepozisyon çözeltisinin pH'sının bir fonksiyonu olarak nanoyapıların boyutlarının değişimi, Şekil 5'te boyuta (nm) karşı pH'nın grafik edilmesiyle incelenmiştir. Cu₂O nanoyapılarının hazırlandığı çözeltilerin pH değerleri arttıkça elde edilen yapıların boyutları azalmıştır. pH'sı 8, 8,35, 8,65, 9, 9,35, 9,65 ve 10 olan çözeltilerden hazırlanan Cu₂O nanoyapılarının boyutları sırasıyla, ortalama olarak 600, 500, 400, 350, 300, 250 ve 200 nm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, boyut ile pH arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu açıkça göstermektedir.

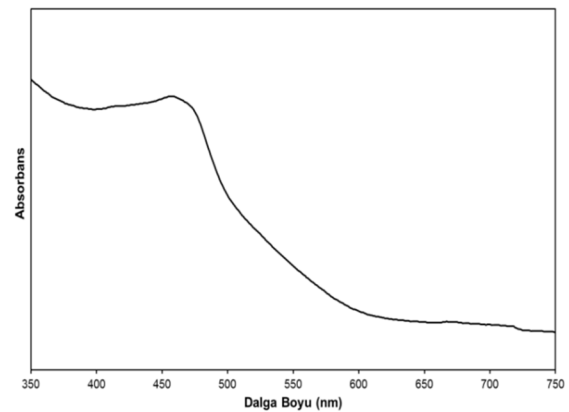
Cu₂O nanoyapılarının elementel bileşimi (Cu/O) EDS tekniğinden yararlanılarak belirlendi. pH'sı 9,65 olan bazik sulu çözeltilerden hazırlanan filmlerin EDS spektrumlarının

kalitatif ve kantitatif analizleri, yapıda sadece Cu ve O bulunduğunu ve stokiometrinin 2/1 (Cu/O) oranına sahip olduğunu gösterir. Buda UPD temelinde dayanan elektrokimyasal yöntemle hazırlanan yapıların Cu₂O olduğunu doğrular.



Şekil 5. pH'nın bir fonksiyonu olarak Cu₂O nanoyapılarının boyutlarının değişimi

Cu₂O nanoyapılarının absorpsiyon özellikleri UV-GB-NIR ölçümleri ile belirlendi. Şekil 6, 350-750 nm aralığında alınan pH'sı 9,65 olan bazik sulu çözeltide elektrokimyasal olarak hazırlanan bileşik yarıiletken bakır (I) oksite ait absorpsiyon spektrumudur. Cu₂O için bilinen bant aralığı enerjisi (E_g) yaklaşık 2,1eV'tur. Bu değer yaklaşık 590 nm dalga boyuna karşılık gelir. Yaptığımız ölçümler neticesinde, Cu₂O nanoyapıları için ölçtüğümüz bant aralığı enerjisi yaklaşık 593 nm dalga sayısına karşılık gelen 2,09 eV olup, bu değer literatürle uyumludur.

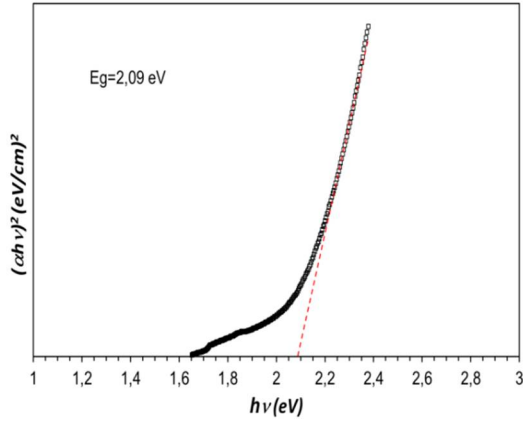


Şekil 6. Bazik sulu çözeltide elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu₂O nanoyapılarının absorpsiyon spektrumu

Elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu₂O nanoyapılarının absorpsiyon spektrumundan yola çıkarak $(\alpha h\nu)^2$ 'nin $h\nu$ 'ye karşı grafik edilerek bant aralığı enerjisi belirlendi. pH'sı 9,65 olan bazik ortamda hazırlanan Cu₂O nanoküpleri için $(\alpha h\nu)^2$ 'nin $h\nu$ 'ye karşı grafik edilmesiyle oluşturulan eğri, Şekil 7'de gösterilmiştir.

Sulu bazik (pH: 9,65) ortamda elektrodepozisyon neticesinde hazırlanan bakır (I) oksit yapılarına ait bant aralığı enerjisi 2,09 eV'tur (Şekil 7). Bu değer, UPD temelinde dayanan elektrokimyasal yöntemle hazırlanan Cu₂O'nin birçok teknolojide kullanılabileceği gibi özellikle, yenilenebilir enerji kapsamında değerlendirilen ve günümüzün en popüler araştırma ve geliştirme sahalarından birisi haline gelen güneş pillerinde kullanılabileceğini göstermektedir. Optik verilerden elde edilen sonuçlara ve Cu₂O'nin görünür bölgedeki ışığı soğurma özelliğine sahip olmasının sonucu olarak Cu₂O, güneş pili malzemesi olarak

kullanılabilir. Bu çalışma ile elektrokimyasal olarak hazırlanan Cu_2O yarıiletkeni, güneş enerjisi uygulamalarında ideal bir soğurucu tabaka olarak görev alabilir.



Şekil 7. Cu_2O nanoküplerinin bant aralığı değerleri

4. Sonuçlar

Cu_2O yarıiletkeni, tüm bazik pH'larda elektrokimyasal olarak hazırlanmaya çalışıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda belirgin olarak Cu_2O 'in pH'sı 8 ile 10 arasında olan bazik sulu ortamlarda elektrokimyasal olarak hazırlanabileceği görüldü. Bu pH değerleri içinde, Cu_2O yarıiletkenini elektrokimyasal olarak hazırlamak için en ideal pH değeri belirlenmeye çalışıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda, çeşitli karakterizasyon teknikleri eşliğinde en ideal Cu_2O 'in pH'ı 9,65 olan bazik sulu çözeltilerden hazırlanabildiği görüldü. Elektrodepozisyon çözeltisinin pH'sının bir fonksiyonu olarak nanoyapıların boyutlarının değişimi incelendiğinde, Cu_2O nanoyapılarının hazırlandığı çözeltilerin pH değerleri arttıkça elde edilen yapıların boyutlarının azaldığı görülmüştür. pH'sı 8, 8,35, 8,65, 9, 9,35, 9,65 ve 10 olan çözeltilerden hazırlanan Cu_2O nanoyapılarının boyutları sırasıyla, ortalama olarak 600, 500, 400, 350, 300, 250 ve 200 nm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, boyut ile pH arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu açıkça göstermektedir. Cu_2O nanoyapılarının kalitatif ve kantitatif analizleri, yapıda sadece Cu ve O bulunduğunu ve stokiometrinin 2/1 (Cu/O) oranına sahip olduğunu gösterir. Buda UPD temelinde dayanan elektrokimyasal yöntemle hazırlanan yapıların Cu_2O olduğunu doğrular. Elektrokimyasal olarak hazırlanan bakır (I) oksit yapılarına ait bant aralığı enerjisi 2,09 eV'tur. Optik verilerden elde edilen sonuçlara ve Cu_2O 'in görünür bölgedeki ışığı soğurma özelliğine sahip olmasının sonucu olarak hazırlanan nano yapıları Cu_2O , güneş enerjisi ile ilgili uygulamalarda kullanılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma, Bingöl Üniversitesi Kimya Bölümü ve Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş ve Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi (BÜBAP) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Grondahl L.O., The copper-cuprous-oxide rectifier and photoelectric cell, Rev. Mod. Phys. 5, 141–168, 1933.
- [2] Balakirev F.F., Betts J.B., Migliori A., Ono S., Ando Y., Boebinger G.S, Signature of optimal doping in

Hall-effect measurements on a high-temperature superconductor, Nature, 424, 912–915, 2003.

- [3] Gobrecht H., Liess H.D., Tausend A., Electrochemische Abscheidung von Metallseleniden, Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem., 67, 930–931, 1963.
- [4] Hodes G., Manassen J., Cahen D., Photoelectrochemical energy conversion and storage using polycrystalline chalcogenide electrodes, Nature, 261, 403–404, 1976.
- [5] Panicker M.P.R., Knaster M., Kröger F.A., Cathodic deposition of CdTe from aqueous electrolytes, J. Electrochem. Soc., 125, 566–572, 1978.
- [6] Tomkiewicz M., Ling I., Parsons W. S., Morphology, properties, and performance of electrodeposited n-CdSe in liquid junction solar cells, J. Electrochem.Soc., 129, 2016–2022, 1982.
- [7] Lokhande C.D., Pulse plated electrodeposition of CuInSe_2 films, J. Electrochem. Soc., 134, 1727–1729, 1987.
- [8] Murase K., Watanabe H., Mori S., Hirato T., Awakura Y., Control of composition and conduction type of CdTe film electrodeposited from ammonia alkaline aqueous solutions, J. Electrochem. Soc., 146, 4477–4484, 1999.
- [9] Erdogan I.Y., Gullu O., Optical and structural properties of CuO nanofilm: Its diode application, Journal of Alloys and Compounds, 492, 378–383, 2010.
- [10] Reddy A.S., Rao G.V., Uthanna S., Reddy P.S., Structural and optical studies on dc reactive magnetron sputtered Cu_2O films, Mater. Lett., 60, 1617–1621, 2006.
- [11] Gu Y., Su X., Du Y., Wang C., “Preparation of flower-like Cu_2O nanoparticles by pulse electrodeposition and their electrocatalytic application”, Appl. Surf. Sci., 256, 5862–66, 2010.
- [12] Oznuluer T., Erdogan I., Sisman I., Demir U., Electrochemical atom-by-atom growth of PbS by modified ECALE method, Chemistry of Materials, 17, 935–937, 2005.
- [13] Oznuluer T., Erdogan I., Demir U., Electrochemically induced atom-by-atom growth of ZnS thin films: A new approach for ZnS codeposition, Langmuir, 22, 4415–4419, 2006.
- [14] Sisman I., Alanyalioglu M., Demir U., Atom-by-atom growth of CdS thin films by an electrochemical co-deposition method: Effects of pH on the growth mechanism and structure, J. Phys. Chem. C, 111, 2670–2674, 2007.
- [15] Oznuluer T., Erdogan I., Bulbul F., Demir U., Characterization of size-quantized PbTe films synthesized by an electrochemical co-deposition method, Thin Solid Films, 517, 5419–5424, 2009.
- [16] Erdogan I.Y., Demir U., Synthesis and characterization of Sb_2Te_3 nanofilms via electrochemical co-deposition method, Journal of Electroanalytical Chemistry, 633, 253–258, 2009.
- [17] Erdogan I.Y., Demir U., One-step electrochemical preparation of the ternary $(\text{Bi}_x\text{Sb}_{1-x})_2\text{Te}_3$ thin films on Au(111): Composition-dependent growth and characterization studies, Electrochimica Acta, 55, 6402–6407, 2010.
- [18] Erdogan I.Y., Demir U., Orientation-controlled synthesis and characterization of Bi_2Te_3 nanofilms, and nanowires via electrochemical co-deposition, Electrochimica Acta, 56, 2385–2393, 2011.



Kadmiyum uygulanan ratlarda lipid peroksidasyon üzerine bal ve polenin antioksidan etkileri*

Halil Şimşek**¹, Mehtap Özçelik², Osman Güler³, Fulya Benzer⁴, Mehmet Çay⁵, Mesut Aksakal⁵

*Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenen TAGEM/GY/07/03/01/128 nolu projeden özetlenmiştir.

Özet

Bu çalışmada kadmiyum (Cd) verilen ratlarda kanda; MDA, GSH, GSH-Px, katalaz, E vitamini, A vitamini ve β-karoten düzeylerine bal ve polen verilmesi ile oluşacak değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma 5 grup üzerinde yapıldı. 1. Grup Kontrol, 2. Grup Cd, 3. Grup Cd+bal, 4. Grup Cd+polen, 5. Grup Cd+bal+polen şeklinde düzenlendi. Uygulama 6 hafta sürdü. Uygulama sonrası plazma E vitamini, A vitamini ve β-karoten düzeyleri ile eritrosit GSH, GSH-Px, katalaz ve MDA düzeyleri ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede kontrol grubunda, Cd grubuna kıyasla, plazma E vitamini ve A vitamini, eritrosit MDA, GSH-Px ve katalaz önemli bulunurken, plazma β-karoten ve eritrosit GSH düzeyinin ise önemsiz olduğu saptandı. Cd grubuna kıyasla plazma E vitamini düzeyi; Cd+bal grubunda önemli, Cd+polen grubunda önemsiz ve Cd+bal+polen grubunda önemli bulundu. Plazma A vitamini; Cd+bal, Cd+polen ve Cd+bal+polen gruplarında önemli bulunurken, β-karoten düzeyinin tüm gruplarda önemsiz olduğu saptandı. Eritrosit GSH-Px aktivitesi; Cd+bal grubunda önemli, Cd+polen grubunda önemsiz ve Cd+bal+polen grubunda önemli bulundu. Katalaz aktivitesinin Cd+bal, Cd+polen ve Cd+bal+polen gruplarında önemli olduğu saptandı. MDA düzeyi; Cd+bal, Cd+polen ve Cd+bal+polen gruplarında önemli bulunurken, GSH düzeyinin ise tüm gruplarda önemsiz olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Bal; polen; kadmiyum; lipid peroksidasyon; antioksidan

Antioxidant effect of honey and pollen on lipid peroxidation in cadmium administered rats

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of orally administered honey and pollen on MDA, GSH, GSH-Px, CAT, vitamin A, vitamin E and β-carotene in Cd expose rats. Animals were divided into 5 groups: Group 1: Control, Group 2: Cd administered, Group 3: Cd+honey, Group 4: Cd+pollen, Group 5: Cd+honey+pollen. The study was lasted for 6 weeks. At the end of the study, serum samples were collected and the levels of MDA, GSH, GSH-Px, CAT, vitamin A, vitamin E and β-carotene were measured. After statistical analyses, while the differences of amount of plasma vitamin E and vitamin A, erythrocyte MDA, GSH-Px and CAT between control and Cd groups were statistically important, Plasma β-carotene and erythrocyte GSH levels were not. The differences of plasma vitamin E were important between Cd and Cd+honey, Cd and Cd+honey+pollen groups. It was not between Cd and Cd+pollen groups. While levels of plasma vitamin A were important between Cd and Cd+honey, Cd and Cd+pollen, Cd and Cd+honey+pollen groups, β-carotene was not in all groups mentioned above. Activities of erythrocyte GSH-Px were important between Cd and Cd+honey, Cd and Cd+honey+pollen but it was not between Cd and Cd+pollen groups. Activities of erythrocyte CAT, were important between Cd and Cd+honey, Cd and Cd+pollen, Cd and Cd+honey+pollen. While the levels of erythrocyte MDA, were important between Cd and Cd+honey, Cd and Cd+pollen, Cd and Cd+honey+pollen, levels of GSH in erythrocyte were not important in all groups.

Keywords: Honey; pollen; cadmium; lipid peroxidation; antioxidant

1. Giriş

Günümüz dünyasında toksik etkisi olan metallerle maruz kalma oranı her geçen gün artmakta ve bunun neticesinde

¹ Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl, Türkiye

² Fırat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Elazığ, Türkiye

³ Tunceli Üniversitesi, Pertek Meslek Yüksekokulu, Tunceli, Türkiye

⁴ Tunceli Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Tunceli, Türkiye

⁵ Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ, Türkiye

**Sorumlu yazar E-posta: hsimsek@bingol.edu.tr

insan ve hayvanlarda değişik dokularda toksikasyona bağlı olarak fonksiyon bozuklukları görülmektedir. Kadmiyum (Cd), çevre kirlenmesi nedeni ile insan sağlığını ciddi oranda tehdit eden endüstride yaygın şekilde kullanılan toksik düzeyi yüksek bir metaldir [1-3]. Kadmiyumun çevre kirliliğine neden olmasında başlıca kaynak; sanayi atıkları,

tarımda kullanılan fosfatlı gübreler, maden ocakları, rafineriler ve bitki koruma amaçlı kullanılan herbisit ilaçlar olduğu bildirilmektedir [4]. Cd doğada yayılma hızı yüksek düzeyde olup insan yaşamı için gerekli temel elementlerden birisi değildir. Tarımda kontrolsüz gübre kullanımı ile üretilen meyve sebzeler, sanayi ve diğer atıklarla kirletilmiş sularla beslen su ürünleri, Cd ile kirletilmiş suların içme suyu olarak kullanımı doğrudan ya da dolaylı sigara dumanına maruz kalma durumları büyük ölçüde canlı organizma için toksik tehdit oluşturmaktadır [5,6]. Cd'un meydana getirdiği sitotoksik etkiye bağlı olarak serbest radikaller oluşmakta ve antioksidan sistemde bozukluk meydana gelmektedir [7,8]. Cd doğrudan serbest oksijen radikallerini üretmemekte mitokondriyal elektron transfer zincirini etkilemek ya da glutatyon tüketimini artırmak sureti ile dolaylı yoldan serbest radikallerin meydana gelmesine katkı sağlamaktadır [9]. Hücrelerde lipid, protein ve karbonhidrat gibi canlı organizma için önemli yeri olan bileşimler serbest radikaller tarafından etkilenmek sureti ile yapılarında bozulmalara bağlı lipid peroksidasyon meydana gelmektedir [10,11].

Dokularda oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan mekanizmalar bulunmaktadır. Antioksidan enzim sistemleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir [12]. Non enzimatik antioksidanlardan en önemlilerinden biride glutatyon (GSH)'dur. GSH, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit radikali (CO₂⁻) ile doğrudan etkileşime girerek hücreyi serbest radikallere karşı korumaktadır [13].

Bal, arılar tarafından çiçeklerden topladıkları nektardan ürettikleri doğal bir üründür. Bal karbonhidrat, glukoz ve fruktoz gibi şeker ihtiva eden önemli bir besin maddesidir [14]. Ayrıca, katalaz, glutatyon reduktaz enzimleri, çinko ve demir gibi bazı mineraller ile A ve E vitamini, bir takım fenoloik bileşikler ve organik asitleri içerisinde bulundurmaktadır [15,16]. Yapılan bilimsel araştırmalarda balın antimikrobiyal [17,18], antiinflamatuvar [19,20] ve antioksidan [21,22] özellikleri olduğu bildirilmektedir. Polen, arılar tarafından çiçeklerden toplanan aminoasit, protein, karbonhidrat, yağ, mineraller ve fenolik bileşenler içeren doğal bir üründür [23]. Yapılan bilimsel çalışmalarda polen ekstraktının insan ve canlı oraganizmayı oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmektedir [24,25].

Bu çalışma ile ratlarda Cd'un oluşturduğu hasar üzerine bal ve polenin kanda lipid peroksidasyon ve bazı antioksidan düzeylerinde meydana getirdiği değişikliklerin araştırılması amaçlandı.

2. Materyal ve metot

2.1. Hayvan materyali

Bu çalışmada canlı ağırlığı 200–230 gr olan 15 haftalık 50 adet Wistar Albino erkek rat kullanıldı. Hayvanlar 15 günlük adaptasyon döneminden sonra her grupta 10'ar adet olmak üzere 5 grup oluşturuldu. 1. Grup: Kontrol grubu olup pelet yem+içme suyu verildi. 2. Grup: Pelet yem+100 ppm CdCl₂ içme suyunda verildi. 3. Grup: Pelet yem+100 ppm CdCl₂ ve 5 gr/l bal içme suyunda verildi. 4. Grup: % 5 polenli pelet yem+100 ppm CdCl₂ içme suyunda verildi. 5. Grup: % 5 polenli pelet yem+100 ppm CdCl₂ ve 5 gr/l bal içme suyunda verildi. Uygulama 6 hafta sürdü ve ratlara yem, içme suyunda bal ve CdCl₂ ad-libitum olarak verildi.

2.2. Yem materyali

Ratların beslenmesinde, Elazığ Yem Fabrikasından alınan rat yemi kullanıldı (Çizelge 1). Polenli yem aynı

fabrikadan temin edilen peletleme öncesi yeme % 5 polen ilavesi ile hazırlandı (Çizelge 2).

Araştırmada deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve 24±3°C) uygun olarak yürütüldü. Araştırma Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Etik Kurulu'ndan (Karar No:24.10.2008/5) alınan onaya göre Yerel Etik Kurulu ilkelerine uyularak yapıldı.

Çizelge 1. Rat yemi bileşimi (Normal)

Yem Maddeleri	(%)
Buğday	30
Mısır	15
Arpa	10
Kepek (Buğday)	5
Soya Küspesi	30
Balık Unu	6,5
Limestone (Mermer Tozu)	2
Tuz	1
Methionin	0,25
*Vitamin ve Mineral Karışımı	0,25

*Vitamin A, D₃, K₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂ ve C, nicotinamide, folic acid, d-biotin, choline chloride, mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt ve selenyum.

Çizelge 2. Rat yemi bileşimi (Polenli)

Yem Maddeleri	(%)
Buğday	28,5
Mısır	14,25
Arpa	9,5
Kepek (Buğday)	4,75
Soya Küspesi	28,5
Balık Unu	6,175
Polen	5
Limestone (Mermer Tozu)	1,9
Tuz	0,95
Methionin	0,2375
*Vitamin ve Mineral Karışımı	0,2375

*Vitamin A, D₃, K₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂ ve C, nicotinamide, folic acid, d-biotin, choline chloride, mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt ve selenyum.

2.3. Kan örneklerinin alınması

Uygulama sonrası ratlar 12 saatlik açlığı takiben eter anestezisi altında, kalpten punksiyon yapılarak EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, (+4) °C'de ve 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazma endorf tüplere alındı ve analizler yapılmaya kadar (-30)°C'de derin dondurucuda saklandı. Eritrosit paketleri endorf tüplerde analiz edilinceye kadar (-30) °C'de derin dondurucuda saklandı ve analiz için 1/9 oranında distile su ile hazırlanan hemolizat kullanıldı.

2.4. Plazma vitamin E, vitamin A ve β-karoten tayini

Plazmada E vitamini Kayden ve ark. [26]'nın metoduna göre (Shimadzu UV-120-01 Spektrofotometer Japan) spektrofotometresi ile ölçüldü. Plazma A vitamini ve β-karoten düzeylerinin belirlenmesi Suzuki ve Katoh [27]'un tanımladığı spektrofotometrik yöntem ile tespit edildi.

2.5. Eritrosit GSH-Px, GSH, katalaz ve lipid peroksidasyon tayini

Eritrosit GSH-Px aktivitesi düzeyi Lawrence ve Burk [28]'un tarif ettiği şekilde ölçüldü. Eritrosit GSH düzeyi Sedlak ve Lindsay [29] tarif ettiği şekilde belirlendi. Eritrosit CAT enzimi tayini Aebi [30]'nin tarif ettiği şekilde

yapıldı. Eritrosit lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehid (MDA) Matkovic ve ark. [31]'nin tarafından modifiye edilen Placer ve ark. [32]'nin yöntemine göre spektrofotometre ile ölçüldü.

2.6. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Eritrosit protein konsantrasyonu Gornal ve ark. [33]'nin tarif ettiği şekilde biüret yöntemi ile saptandı.

2.7. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılığın önemi tek yönlü ANOVA ile grup içindeki farklılıkların derecesi Duncan testi ile analiz edildi. Veriler; ortalama ± standart hata olarak gösterildi [34].

3. Bulgular ve tartışma

Yapılan bu çalışmada plazma vitamin E, vitamin A ve β-karoten düzeyleri Çizelge 3'de, eritrosit GSH-Px, GSH, CAT ve MDA konsantrasyonları Çizelge 4'de gösterildi.

Önemli endüstriyel ve çevresel kirleticilerden olan ve canlılar üzerinde değişik toksik etkileri olan Cd esansiyel olmayan ağır metallere biridir [35]. Cd tarafından meydana getirilen hücrel toksisitenin oksidatif stres ile ilişkili olduğu; başlıca CO₂⁻, H₂O₂, ·OH ve NO üretimine yol açtığı ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA artırdığı, antioksidan enzimlere zarar verdiği, tiol proteinlerde değişikliklere neden olduğu, enerji metabolizmasını inhibe ettiği, DNA yapısında ve membran fonksiyonunda bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir [36,37].

Yang ve ark. [38], Cd uygulaması sonrası ratlarda kontrol grubuna kıyasla MDA düzeyindeki artışın ve GSH-Px aktivitesindeki azalmanın önemli olduğunu gözlemişler. Kheradmand ve ark. [39], ratlarda Cd ile oluşturulan toksikasyonda Cd verilen grupta kontrol grubuna kıyasla GSH, GSH-Px, SOD ve CAT aktivitelerinde meydana gelen azalmanın ve MDA düzeyindeki artışın istatistiksel açıdan önemli olduğunu saptamışlar. Pillai ve ark. [40], yaptıkları çalışmada ratlarda Cd'un 0.05 mg/kg olacak şekilde

intraperitoneal olarak 15 gün süreyle verilmesini takiben kontrole kıyasla karaciğer dokusunda CAT, GSH ve MDA düzeylerindeki değişimin önemsiz olduğunu saptamışlar. Stajin ve ark. [41], oral yolla iki ay süre ile 200 ppm düzeyinde CdCl₂ verilmesi ile oluşan oksidatif strese bağlı olarak GSH-Px, ve Vitamin E düzeylerindeki farkın önemli, GSH ve CAT düzeylerindeki farkın ise önemsiz olduğunu gözlemişler. Lekeziccan ve ark. [42], ratlarda Cd ile oluşturulan oksidatif hasara karşı etil piruvatın etkisini araştırmışlar. Cd verilen grupta kontrol grubuna kıyasla doku MDA düzeyinde meydana gelen artışı istatistiksel olarak önemli bulmuşlar. Ognjanovic ve ark. [43], Cd'un ratlarda 15 mg/gün/kg dozda verilmesi ile karaciğer dokusunda GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerindeki azalmanın önemli düzeyde olduğunu saptamışlar. Cd'un eritrosit membranlarında meydana getirdiği oksidatif hasar sonrası eritrositlerin antioksidan sistemini değiştirerek ve lipid peroksidasyon oluşumuna bağlı olarak eritrositlerin membranlarında oksidatif hasar oluşturmaktadır [43]. Karaca ve ark. [44], ratlarda Cd ile oluşturulan oksidatif hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada Cd verilen grupta kontrol grubuna kıyasla doku SOD ve GSH-Px aktivitesinde azalma ve MDA düzeyinde oluşan artışı istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlar. Kara ve ark. [45], CdCl₂ ün değişen dozlarında verilmesi ile oluşturulan oksidatif stres sonrası serum, karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyon düzeyi farkının kontrol grubuna göre önemli olduğunu tespit etmişler.

Yaptığımız bu çalışmada Cd ile oluşturulan toksisite sorası plazma E ve A vitamini düzeyi kontrol grubuna kıyasla önemli bulunurken, β-karoten düzeyinin önemsiz olduğu saptandı. Bu sonucun araştırmacıların [41] bildirimleri ile benzer olduğu gözlemlendi. Araştırmada kontrol grubu ile Cd grubu arasında eritrosit; MDA, GSH-Px ve CAT düzeylerinin önemli olduğu GSH düzeyinin ise önemsiz olduğu gözlemlendi. Bu değerler, araştırmacıların [38,39,42,43,44,45] bulguları ile benzerlik gösterirken, diğer araştırmacıların [40] bulguları ile benzer olmadığı saptandı. Burada Cd'un eritrositlerin membranlarında oluşturduğu oksidatif hasarla orantılı olarak antioksidan enzim düzeyleri azalmakta ve MDA düzeyinde artış meydana gelmektedir [43].

Çizelge 3. Plazma E vitamini, A vitamini ve β-Karoten düzeyleri

Gruplar	Vitamin E (mmol/l)	Vitamin A (µmol/l)	β-Karoten (µmol/l)
Kontrol	20,989±1,784 ^a	0,812±0,036 ^c	0,093±0,011
Cd	13,838±1,107 ^b	0,509±0,061 ^d	0,064±0,005
Cd+Bal	17,588±1,619 ^a	0,739±0,044 ^c	0,077±0,008
Cd+Polen	17,988±1,572 ^{ab}	0,702±0,049 ^c	0,065±0,008
Cd+Bal+Polen	19,326±2,036 ^a	0,729±0,073 ^c	0,078±0,005

Ortama±SH; (a,b) p<0,05, (c,d) p<0,01 (n=10)

Aynı sütunda yer alan farklı harfleri gösteren değerler birbirinden farklıdır.

Çizelge 4. Eritrosit GSH, GSH-Px, Katalaz ve MDA düzeyleri

Gruplar	GSH-Px (IU/gr protein)	GSH (µmol/ml)	CAT (k/gr hb)	MDA (nmol/ml)
Kontrol	103,080±4,446 ^a	0,101±0,007	1,020±0,055 ^d	14,459±0,655 ^c
Cd	70,926±4,892 ^c	0,091±0,006	0,626±0,054 ^e	20,098±0,932 ^a
Cd+Bal	89,565±4,758 ^b	0,093±0,005	0,783±0,068 ^d	16,057±0,735 ^{bc}
Cd+Polen	74,533±5,372 ^c	0,0913±0,005	0,684±0,050 ^d	16,543±0,597 ^{bc}
Cd+Bal+Polen	88,973±2,527 ^b	0,0910±0,005	0,764±0,092 ^d	16,949±0,910 ^b

Ortama±SH; (a,b,c) p<0,001, (d,e) p<0,01 (n=10)

Aynı sütunda yer alan farklı harfleri gösteren değerler birbirinden farklıdır.

Dudov ve Starodub [46], ratlarda polen verilmesi sonrası eritrosit GSH ve GSH-Px aktivitesinin kontrole göre önemli olduğu bunun yanında CAT düzeyinin yüksek ancak istatistiksel açıdan önemsiz olduğunu saptamışlar. Mohamed ve ark. [47], ratlarda sigaranın testislerde oluşturduğu oksidatif hasara karşı balın koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada sigara dumanına maruz bırakılan grupta doku MDA düzeyinde artış GSH, GSH-Px, CAT ve SOD aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Bal verilen grupta ise sigara dumanına maruz bırakılan gruba kıyasla MDA düzeyinde azalma ve GSH, GSH-Px, CAT ve SOD aktivitelerinde artışın olduğunu saptamışlar. Eraslan ve ark. [48], ratlarda oluşturdukları toksisiteye bağlı olarak oksidatif strese karşı polenin etkisini araştırmışlar, doku ve eritrosit örneklerinde CAT, GSH-Px ve lipit peroksidasyon değişimlerini değerlendirmişler. Polenin, bu parametreler üzerinde olumlu düzeyde etki ettiğini saptamışlar. Korkmaz ve Kolankaya [49], yaptıkları araştırmada ratlarda toksikasyon sonrası oksidatif strese bağlı olarak 30 gün süreyle 0,275 gr/kg dozda anzer balının verilmesi sonrası GSH düzeyi artışını kontrole göre anlamlı bulmuşlar. Saral ve ark. [50], ratlarda CCl₄ ile oluşturulan oksidatif hasara karşı arı ürünlerinin koruyucu etkisini araştırmışlar. Çalışmada karaciğer dokusu MDA düzeyinin CCl₄ verilen grupta, kontrol grubuna göre artışı yüksek, bal ve polen verilen grupların CCl₄ verilen gruba göre azalmayı istatistiksel olarak önemli bulmuşlardır. Plazma SOD aktivitesinin CCl₄ verilen grupta, kontrol grubuna göre azalma önemli bulunurken, bal ve polen verilen gruplarda ise CCl₄ verilen gruba göre artış istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu saptanmıştır. Plazma CAT aktivitesinin, CCl₄ verilen gruba göre bal ve polen gruplarında ise artışın olmadığı aksine azalmanın meydana geldiği gözlemlenmiştir. Eraslan ve ark. [51], ratlarda carbaryl isimli insektisit ile oluşturulan oksidatif hasara karşı polenin etkisini araştırmışlar. Araştırmada plazma ve dokuda MDA, eritrosit ve dokuda CAT ve GSH-Px aktivitelerinin polen verilen grupla kontrol grubu arasında farkın önemli olduğunu saptamışlar. Abdulmajeed ve ark. [52], ratlarda kurşunla oluşturulan oksidatif hasara karşı balın etkisi üzerine yaptıkları çalışmada beyin dokusu MDA düzeyini kurşun verilen grupta kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak önemli, kurşun ve bal verilen grupta ise kontrole göre düşük ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit etmişler. GSH düzeyini kontrol grubuna göre kurşun verilen grupta azalmayı önemli, bal ve kurşun verilen grupta yalnız kurşun verilen gruba göre artışı istatistiksel olarak önemli bulmuşlar. SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre kurşun verilen grupta azalma önemli, bal ve kurşun verilen grupta yalnız kurşun verilen gruba göre artış istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür. CAT aktivitesinde ise tüm gruplar arasında değişimin önemli olmadığı saptanmıştır.

Bu araştırmada, Cd grubu ile Cd+bal grubu arasında plazma E vitamini düzeyi; önemli, Cd+polen grubunda ise önemsiz ve Cd+bal+polen grubunda ise önemli bulundu. Plazma A vitamini; Cd+bal, Cd+polen ve bal+polen gruplarında önemli bulunurken, β-karoten düzeyinin ise tüm gruplarda önemsiz olduğu saptandı. Eritrosit GSH-Px aktivitesi; Cd+bal grubunda önemli, Cd+polen grubunda önemsiz ve Cd+bal+polen grubunda ise önemli bulundu. CAT aktivitesi; Cd+bal, Cd+polen ve Cd+bal+polen gruplarında önemli olduğu gözlemlendi. MDA düzeyi; Cd+bal, Cd+polen ve Cd+bal+polen gruplarında önemli GSH düzeyinin ise tüm gruplarda önemsiz olduğu tespit edildi. GSH-Px, düzeyindeki değişim; Cd+polen grubunda, araştırmacıların [46,48,51] bildirimleri ile benzerlik göstermemektedir. Bu durumun araştırmada ratlara verilen polenin miktarından ve verilmiş şekliyle kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Cd+bal grubunda ise araştırmacıların [50,52] çalışmaları ile paralellik göstermektedir. CAT ve

MDA düzeylerindeki değişim Cd+polen grubunda, araştırmacıların [48,50,51] bildirimleri ile uygunluk saptanırken, diğer araştırmacıların [46] bulguları ile uygun olmadığı görüldü. MDA düzeyindeki farklılık Cd+polen grubunda, araştırmacıların [48,50,51] sonuçları ile benzerlik göstermektedir. GSH düzeyindeki değişimin, Cd+polen grubunda araştırmacıların [46], Cd+bal grubunda diğer araştırmacıların [49] bildirimleri ile benzerlik göstermemektedir. Bu durumun bal ve polenin verilmiş şekli ve miktarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4. Sonuçlar

Yapılan bu çalışmada, Cd uygulamasının oksidatif hasara bağlı olarak ratlarda kan lipit peroksidasyon düzeyini artırdığı, bunu yanında bazı antioksidan düzeylerini azalttığı saptandı. Cd uygulamasının yanında bal, polen ve bal+polenin birlikte hem koruyucu ve hem de tedavi amacıyla kullanılmasına bağlı olarak lipit peroksidasyon düzeyini azaltırken bazı antioksidan parametreleri artırdığı tespit edildi. Böylelikle bal ve polenin, canlı organizmada Cd ve diğer toksik etkenlerin oluşturabileceği oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici amaçla uygulanmasının, bazı antioksidanların aktivitelerinde artışa yönelik olumlu etkilerinin olduğu düşünülmekte ve kullanılması tavsiye edilmektedir.

Kaynaklar

- [1] Stohs SJ., Bagchi D., Hassoun E., Bagchi M., Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19, 201-213, 2000.
- [2] Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opendakker K., Nair AR., Munters E., Artois TJ., Nawrot T., Vangronsveld J., Smeets K., Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23, 927-940, 2010.
- [3] Karbownik M., Gitto E., Lewinski A., Reiter RJ., Induction of lipid peroxidation in hamster organs by the carcinogen cadmium: amelioration by melatonin. *Cell. Biol. Toxicol.*, 17, 33-40, 2001.
- [4] Baldwin DR., Marshall WJ., Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Ann. Clin. Biochem.*, 36, 267-300, 1999.
- [5] Tekelioğlu M., Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme, Erkek Üreme Sistemi. Ankara Üniv. Tıp Fak. Yay., Ankara, sayfa 231-244, 2002.
- [6] Baum JW., Liu J., Klaassen CD., Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 15-22, 1993.
- [7] Casalino E., Calzaretto G., Sblano C., Landriscina C., Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179, 37-50, 2002.
- [8] Lopez E., Arce C., Oset-Gasque MJ., Canadas S., Gonzalez MP., Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free. Radic. Biol. Med.*, 40, 940-951, 2006.
- [9] Romero A., Caride A., Pereiro N., Lafuente A., Modulatory effects of melatonin on cadmium-induced changes in biogenic amines in rat hypothalamus. *Neurotox. Res.*, 20, 240-249, 2011.

- [10] El-Sokkary GH., Nafady AA., Shabash EH., Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73, 456-463, 2010.
- [11] Aydoğdu N., Erbaş H., Kaymak K., Taurin, melatonin ve n-asetilsisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri. *Trakya Univ. Tıp Fak. Derg.*, 24, 43-48, 2007.
- [12] Dobashi K., Ghosh B., Orak JK., Singh I., Sing AK., Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol. Cell. Biochem.*, 205, 1-11, 2000.
- [13] Meister A., Anderson ME., Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711-760, 1983.
- [14] Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu S., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F., Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food. Chem.*, 100, 526-534, 2007.
- [15] Gheldof N., Wang XH., Engeseth NJ., Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5870-5877, 2002.
- [16] Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K., Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J. Chromatogr.*, 1187, 18-24, 2008.
- [17] Tan HT., Rahman RA., Gan SH., Halim AS., Hassan SA., Sulaiman SA., Kimpal-Kaur B., The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC. Complement. Altern. Med.*, 9, 34, 2009.
- [18] Molan PC., The Antibacterial Activity of Honey. 1. The Nature of the Antibacterial Activity. *Bee World*, 73, 5-28, 1992.
- [19] Prakash A., Medhi B., Avti PK., Saikia UN., Pandhi P., Khanduja KL., Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. *Phytother. Res.*, 22, 1511-1519, 2008.
- [20] Bilsel Y., Bugra D., Yamaner S., Bulut T., Cevikbas U., Turkoglu U., Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Dig. Surg.*, 19, 306-312, 2002.
- [21] Berretta G., Granat P., Ferrero M., Orioli M., Facino RM., Standardization of antioxidant properties of honey by combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.*, 533, 185-191, 2005.
- [22] Mohamed M., Sirajudeen KNS., Swamy M., Yaacob NS., Sulaiman SA., Studies on the antioxidant properties of tualang honey of Malaysia. *Afr. J. Trad. CAM.*, 7, 59-63, 2010.
- [23] Cheng N., Ren N., Gao H., Lei X., Zheng J., Cao W., Antioxidant and hepatoprotective effects of Schisandra chinensis pollen extract on CCl4-induced acute liver damage in mice. *Food. Chem. Toxicol.*, 55, 234-240, 2013.
- [24] LeBlanc BW., Davis OK., Boue S., DeLuca A., Deeb T., Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food. Chem.*, 115, 1299-1305, 2009.
- [25] Morais M., Moreira L., Feas X., Estevinho LM., Honeybeecollected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food. Chem. Toxicol.*, 49, 1096-1101, 2011.
- [26] Kayden HJ., Chow CK., Bjarnson LK., Spectrophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. *J. Lip. Res.*, 14, 533-540, 1973.
- [27] Suzuki J., Katoh N., A Simple and cheap methods for measuring serum vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn. Vet. Sc.*, 52 (6), 1282-1284, 1990.
- [28] Lawrence RA., Burk RF., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71 (4), 952-958, 1976.
- [29] Sedlak J., Lindsay RHC., Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-205, 1968.
- [30] Aebi H., Catalase. In vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126, 1984.
- [31] Matkovic B., Szabo I., Varga IS., Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways (in Hungarian). *Lab. Diag.*, 15, 248-249, 1988.
- [32] Placer ZA., Cushmann LL., Johnson BC., Estimation of products of lipid peroxidation in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16, 359-364, 1966.
- [33] Gornal AG., Bardawill CJ., David MM., Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751, 1975.
- [34] Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V., Biyoistatistik Özdemir Basım Yayın ve Dağıtım LTD. Şti. 6. Baskı, ANKARA, 1995.
- [35] Karabulut BÖ., Koyutürk M., Bolkent Ş., Yanardağ R., Tabakoğlu OA., Siçan tiroid bezinde kadmiyum hasarına karşı C vitamini, E vitamini ve selenyumun kombine kullanılmasının etkileri. *İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Derg.*, 35, 174-180, 2004.
- [36] Jurczuk M., Brzoska MM., Moniuszko-Jakoniuk J., Galazyn-Sidoreczuk M., Kulikowska-Karpinska E., Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food. Chem. Toxicol.*, 42, 429-438, 2004.
- [37] Lopez E., Arce C., Oset-Gasque MJ., Canadas S., Gonzales MP., Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free. Radic. Biol. Med.*, 40, 940-95, 2006.
- [38] Yang JM., Arnush M., Chen OY., Wu XD., Pan B., Jiang XZ., Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod. Toxicol.*, 17 (5), 553-560, 2003.
- [39] Kheradmand A., M. Alirezaei M., Dezfoulian O., Biochemical and histopathological evaluations of ghrelin effects following cadmium toxicity in the rat testis. *Andrologia*, 47, 634-643, 2015.

- [40] Pillai A., Gupta S., Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: Effects of vitamin E and Mn²⁺. *Free Radic. Res.*, 39 (7), 707-712, 2005.
- [41] Stajn A., Zikić R., Ognjanović B., Saicić ZS., Pavlović SZ., Kostić MM., Petrović VM., Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 117 (2), 167-172, 1997.
- [42] Lekesizcan A., Sönmez MF., Sıçan testis dokusunda kadmiyum ile oluşturulan hasar üzerine etil pirüvatın etkilerinin araştırılması. *Fırat Tıp Derg.*, 21 (1), 17-23, 2016.
- [43] Ognjanović B., Zikić RV., Saicić ZS., Kostić MM., Petrović VM., The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *Physiol. Res.*, 44 (5), 293-300, 1995.
- [44] Karaca Ö., Sunay FB., Kuş MA., Gülcen B., Özcan E., Ögetürk M., Kuş İ., Kadmiyum ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarına karşı melatoninin etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerde incelenmesi. *Fırat Tıp Derg.*, 19 (3), 110-115, 2014.
- [45] Kara H., Karataş F., Canatan H., Effect of single dose cadmium chloride administration on oxidative stress in male and female rats. *Turk J. Anim. Sci.*, 29, 37-42 2005.
- [46] Dudo IA., Starodub NF., Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged intake of honey bee flower pollen load. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 66 (6), 94-96, 1994.
- [47] Mohamed M., Sulaiman SA., Jaafar H., Sirajudeen KNS., Antioxidant protective effect of honey in cigarette smoke-induced testicular damage in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 5508-5521, 2011.
- [48] Eraslan G., Kanbur M., Silici S., Liman BC., Altınordulu Ş., Sarıca ZS., Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 72, 931-937, 2009.
- [49] Korkmaz A., Kolankaya D., Anzer honey prevents n-ethymaleimide-induced liver damage in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 61, 333-337, 2009.
- [50] Saral Ö., Yıldız O., Yazıcıoğlu RA., Yuluğ E., Canpolat S., Öztürk F., Kolaylı S., Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turk J. Med. Sci.*, 46, 194-202. 2016.
- [51] Eraslan G., Kanbur M., Silici S., Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicol.*, 47, 86-91, 2009.
- [52] Abdulmajeed WI., Sulieman HB., Zubayr MO., Imam A., Amin A., Bliaminue SA., Oyewole LA., Owayole BV., Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male wistar rats- a preliminary study. *Metabolic. Brain Disease*, 31, 37-44, 2016.



Türk Doğa ve Fen Dergisi Turkish Journal of Nature and Science

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



Astragalus gummifer çiçeklerinin etanol özütünün PC-3 ve HUVECs üzerindeki biyolojik aktivitesi

Ekrem Darendelioğlu¹, Musa Tartık¹, Gürkan Aykutoğlu¹, Gıyasettin Baydaş*²

Özet

Astragalus (Fabaceae) türleri dünyada yaklaşık 3000 taksonla karakterize edilirken, Türkiye’de 210’u endemik olan 463 taksonla ifade edilir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi zengin floraya sahiptir ve bu bölgedeki yerel halkın çoğu doğal bitkileri beslenme ve tedavi amaçlı kullanmaktadır.

Astragalus bitkisi çok önemli fitokimyasallar olan flavonoidler, fenolik asitler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşiklere sahiptir. Bu fitokimyasal bileşikler anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-bakteriyel ve anti-oksidan özellikler taşımaktadır. Bu çalışmamızda *Astragalus gummifer* (*A. gummifer*) çiçeğinin etanol özütünün hücre sitotoksitesisi ve anti-mikrobiyal aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, *A. gummifer* çiçeği özütünün normal ve kanserli hücrelerde oksidatif hasar ve apoptoz üzerindeki karşılaştırmalı etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda, *A. gummifer* çiçeğinin etanol özütü anti-mikrobiyal ve anti-oksidan etki göstermiştir. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ile indüklenen İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinde (HUVECs) Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumu ve Lipit Peroksidasyonda (LPO) artış olurken, *A. gummifer* çiçeği özütünün bunu düşürdüğü görülmüştür. Diğer taraftan ise *A. gummifer* çiçeği özütü Prostat Kanseri Hücrelerinde (PC-3) ROS oluşumu ve LPO seviyesini arttırmıştır. Ayrıca, *A. gummifer* PC-3 hücrelerinde apoptozla ilgili olarak DNA fragmentasyonuna neden olmuştur. Sonuç olarak *A. gummifer* normal hücrelerde anti-oksidan etki gösterirken, kanser hücrelerinde pro-oksidan etki göstererek bu yolla bu hücrelerde apoptoza neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus gummifer*; PC-3; HUVECs; LPO; ROS; Anti-mikrobiyal

The biologic activity of ethanol extract of *Astragalus gummifer* on PC-3 and HUVECs

Abstract

Astragalus (Fabaceae) species are characterised by around 3000 taxa in the world whereas they are represented by 463 taxa, 210 of them are endemic in Turkey. Eastern Anatolia has a rich flora; plurality of the folks living in country regions usually takes advantages of plants for nourishment and medical purposes.

Astragalus species have significant phytochemicals such as flavonoids, phenolic acids, steroids, amino acids and inorganic compounds. These phytochemical compounds are responsible for the several biologic effects such as anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant. The ethanol extract of *A. gummifer* was investigated for cell cytotoxicity and anti-microbial effects.

The aim of this study was to investigate comparative effects of *A. gummifer* flower extract on oxidative damage and apoptosis in normal and cancer cells. In the present study, the ethanol extract of *A. gummifer* flower demonstrated anti-microbial and anti-oxidant activities. Our results also showed that the ethanol extract of *A. gummifer* flower led to decrease Reactive Oxygen Species (ROS) creation and Lipid Peroxidation (LPO) levels in Hydrogen Peroxide (H₂O₂) induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). However, this extract activity led to increase ROS generation and LPO levels in Prostate Cancer cells (PC-3). Additionally, the ethanol extract of *A. gummifer* flower caused DNA fragmentation as known a hallmark of apoptosis in PC-3 cells. As a result, *A. gummifer* showed anti-oxidant activity in normal cells, whereas its pro-oxidant activity led to apoptosis in cancer cells.

Keywords: *Astragalus gummifer*; PC-3; HUVECs; LPO; ROS; Anti-microbial

Kısaltmalar: Hidrojen Peroksit (H₂O₂); İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (HUVECs); Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE); Lipit Peroksit (LPO); Luria Broth (LB); Malondialdehyde (MDA); Maya ekstrakt peptone dekstroza (YPD); Mikrogram/mililitre (µg/ ml); Mikromolar (µM); Nitrik Oksit (NO); Prostat Kanseri Hücreleri (PC-3); Reaktif Oksijen Türleri (ROS); Suda Çözülebilir Tetrazolium-1 (WST-1); Thiobarbiturik Asit Reaktif Substansler (TBARS); Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi/Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre (HPLC/MS/MS).

¹ Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

² Yüksek Öğretim Kurumu, Denetleme Kurulu, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-posta: baydas@hotmail.com

1. Giriş

Dünyada yaklaşık 3000 taksonla karakterize edilen *Astragalus* (Fabaceae) türleri Türkiye’de 210 tanesi endemik olan 463 taksonla ifade edilmektedir. *Astragalus gummifer* (*A. gummifer*) Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika’da geniş dağılım gösteren çalı şeklinde bitkidir [1].

Astragalus türleri anti-bakteriyel, anti-kanser ve anti-oksidan özellikteki flavonoidler, fenolik asitler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşikler içerir [2,3]. Bu yüzden çeşitli *Astragalus* türleri kanser, diyabet ve viral hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [4,5].

Astragalus türlerinin kullanıldığı tedavilerdeki etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir [6,7]. Ionkova` ya göre [8, 9], *Astragalus* türleri biyolojik olarak oldukça etkili bileşikler olan polisakkaritler, saponinler ve flavonoidlere sahiptirler. Örneğin, Türkiye’deki *Astragalus* türleri 5 farklı aglikon içeren yaklaşık 70 sikloarten tipinde saponin içerir [10-13]. *Astragalus* saponinlerinin immun sistem reaksiyonlarındaki rolleri hakkında az sayıda makale bulunmaktadır. Farklı *Astragalus* türlerinden elde edilen bazı saponinlerin interlokin-2 (IL-2) aktivitesini indükleyerek immun sistemi düzenlediği ve anti-kanser etki gösterdiği düşünülmektedir [14]. Son yapılan çalışmalarda, *Astragalus*’un içerdiği saponinlerinin apoptozu tetiklediği ve *Astragalus*’taki polisakkaritlerin nitrik oksit sentaz (NOS) gen ekspresyonunu etkileyerek makrofajları düzenlediği gösterilmiştir [5]. *Astragalus*’ ta bulunan flavonoid bileşiklerden quercetin ve naringenin çoklu hidroksil gruplarıyla peroksidikallere karşı oldukça yüksek anti-oksidan aktivite göstermektedir [15,16].

Astragalus köklerinden elde edilen flavonoidler, saponinler ve polisakkaritler membranlarda meydana gelen serbest radikal hasarlarını azaltmaktadır [8,9]. *Astragalus membranaceus* türünden elde edilen saponinler, süperoksit anyonlar ve hidroksil radikallere karşı anti-oksidan özelliğe sahiptir. Bu saponinlerin, oksidatif stres kaynaklı prematüre diyabetik nefropati’ye karşı olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir [17]. *Astragalus mongholicus* türünde ise anti-oksidan aktivite gösteren; formononetin, calycosin ve calycosin-7-O-β-D-glucosidenin varlığı bilinmektedir [18, 19]. Bunların yanı sıra, *Astragalus* türlerinden elde edilen astragalosid’in *in vivo* çalışmalarla oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir [20].

Astragalus türlerinin anti-mikrobiyal etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamasına karşın *Astragalus alexandrinus*, *verrucocus* ve *trigonus* türlerinden izole edilen Astragaliquinone, 8-methoxyvestitol, 7-hydroxy-2',3',4'-trimethoxyisoflavyon ve astraverucins I-VI saf saponinlerin anti-mikrobiyal özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [21,22]. Ayrıca, Çin’in belli bölgelerinde tedavi amacı ile kullanılan *Astragalus membranaceus*, *siculus* ve *melanophrurius* türlerinde de anti-mikrobiyal özellik gösteren polisakkaritlerin varlığına rastlanılmıştır [23-25].

Bu çalışmanın amacı, *A. gummifer* çiçeği özütünün normal ve kanserli hücrelerde oksidatif hasar ve apoptoz üzerindeki karşılaştırmalı etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda *A. gummifer* çiçeklerinin etanol özütü elde edilerek anti-mikrobiyal aktivitesinin incelenmesi ve aynı zamanda hem prostat kanser hücrelerinde (PC-3) hem de İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinde (HUVECs), *A. gummifer* çiçeğinin reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipid peroksidasyonu (LPO) üzerindeki etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca hem hücre canlılığı hem de apoptozun bir göstergesi olan DNA fragmentasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve metot

2.1. *A. gummifer*’e ait etanol özütünün hazırlanışı

A. gummifer türüne ait örnekler Türkiye’de Bingöl ili kırsalından toplandı. Bitkiye ait çiçeklerden 10 gr tartılarak 200 ml etanol içerisinde oda sıcaklığında 24 saat 90 rpm’ de çalkalanarak süspansiyon elde edildi. Daha sonra özüt Whatman No. 1 filtre kâğıdıyla süzülerek alındı. En sonunda etanolün vakumlu inkübatör yardımıyla buharlaştırılmasıyla saf özüt elde edildi. Bu özüt kuru ve karanlık stok koşulları altında saklandı.

2.2. Hücre kültürü

PC-3 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1435) firmasından temin edildi. PC-3 hücreleri %10 fetal sığır serum ve %1 oranında penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu içeren RPMI 1640 hücre besiyerinde 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler 8-10 pasaj aralığında kullanıldı. HUVECs hücreleri ise Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezinden temin edildi. HUVECs hücreleri fetal sığır serum, insan fibroblast büyüme faktörü (hFGF), insan epitel büyüme faktörü (hEGF), hidrokortison, gentamisin-amfoterisin-B, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve askorbik asit içeren özel hazırlanmış endotel hücre büyüme besiyerinde (Lonza, USA) 37° C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler 5-10 pasaj aralığında kullanıldı.

2.2.1. Deneysel hücre grupları

PC-3 hücreleri üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda herhangi bir ajan uygulanmayarak hücrelerin sadece besiyerinde 24 saat büyümesi sağlandı. *A. gummifer* gruplarında (Suda Çözülebilir Tetrazolium-1) WST-1 sonuçlarına göre elde edilen en iyi iki doz (250 ve 500 µg/ml) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. HUVECs hücreleri ise dört gruba ayrıldı. Kontrol grubunda herhangi bir ajan uygulanmadı. 400 µM Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (oksidatif hasar artırıcı ajan) [26] pozitif kontrol olarak 24 saat uygulandı. *A. gummifer* gruplarında 400 µM H₂O₂ ile birlikte 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarda *A. gummifer* çiçek özütü 24 saat boyunca uygulandı.

2.3. Hücre canlılık analizi

A. gummifer çiçek özütünün değişik dozlarda PC-3 hücrelerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için WST-1 hücre canlılık analiz kiti (ClonTECH Laboratories) kullanıldı. PC-3 hücreleri 96 kuyucuklu-platelere ekildi (5 x 10³ hücre/kuyucuk). *A. gummifer* çiçek özütü 60, 120, 250, 500 ve 1000 µg/ml dozlarında hücrelere uygulandı. Ayrıca negatif kontrol olarak *A. gummifer* çiçeği özütünün yukarıdaki dozlarda besiyerine eklendiği ancak hücrelerin bulunmadığı grupta blank olarak kullanıldı. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 5 µl WST-1 eklenecek şekilde 37° C’de 4 saat inkübasyona bırakıldı. 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbanı mikro-plaka okuyucu (Molecular Devices, USA) kullanılarak ölçüldü (referans dalgaboyu: 630 nm).

2.4. İntrasellüler ROS miktarlarının belirlenmesi

PC-3 ve HUVECs hücrelerinde ROS ölçümü bir floresan belirteç olan 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diasetat (DCFH-DA) kullanılarak yapıldı. Hücreler deneysel hücre grupları bölümünde belirtildiği şekilde

gruplandırılarak hazırlandı. Daha sonra hücreler toplanarak her bir gruba 1 x 10⁶ hücre için 5 µl DCFH-DA eklendi. Hücreler karanlık ortamda 37° C’de 1 saat boyunca inkübe edildi. Her bir grubun floresan şiddeti spektrofotometre (Perkin Elmar, USA) kullanılarak ölçüldü (eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 485 ve 525 nm) [27].

2.5. Lipit peroksidasyon analizi

Lipid peroksidasyon analizi malondialdehitten (MDA) oluşan tiobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) ölçümüne göre yapıldı. PC-3 ve HUVECs hücreleri deneysel hücre grupları bölümünde belirtildiği gibi inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler toplanarak 3000 rpm’de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Hücrelere 250 µl trikloroasetik asit (%70 w/v) ve 1 mL tiobarbitürik asit (%0,8 w/v) eklendi. Ardından hücreler 100° C’de kaynayan suda 30 dk bekletildi. Hücreler buzda 5 dk tutularak soğutuldu. Daha sonra 15000 rpm’de 10 dk boyunca santifürij edilerek süpernatantlar elde edildi ve süpernatantların absorpsansı 532 nm’de mikro-plaka okuyucuda (Molecular Devices, USA) ölçüldü. Malondialdehid bis standart olarak kullanıldı. Ölçümler µM olarak ifade edildi [28].

2.6. *A. gummifer* anti-mikrobiyal test hazırlanışı

A. gummifer çiçeği etanol özütünün anti-mikrobiyal aktivitesi *S. cerevisiae* ile zararlı mikroorganizmalar olarak kabul edilen *E. coli*, *S. aureus* ve *E. aerogenes* üzerinde test edildi. Mikroorganizmaların sayısı 600 nm absorpsan altında Spectra MaxPlus384 Mikro plaka okuyucu (Molecular Devices, USA) ile ölçüldü. Bakteri ve maya kültürleri sıvı besiyerlerinde hazırlandı. Luria broth (LB) besiyeri bakteriler için, maya ekstrakt peptone dekstroza (YPD) besiyeri ise maya için kullanıldı ve mikroorganizmalar 32 °C, 100 rpm şartlarında gece boyu çalkalayıcıda inkübe edildi. Her kuyusunda 8,0 x 10⁶ mikroorganizma bulunan 96 kuyucuklu-plateler anti-mikrobiyal test için kullanıldı. Örnekler 3 gruba ayrıldı: birinci grup negatif kontrol, *A. gummifer* çiçeği özütünün çeşitli dozlarda besiyerine eklendiği ancak mikroorganizmaların bulunmadığı; ikinci grup pozitif kontrol, besiyerine mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bilinen antibiyotiklerin eklendiği; üçüncü grup ise mikroorganizmalara karşı çeşitli dozlarda *A. gummifer* çiçeği özütünün eklendiği gruplar olacak şekilde tasarlandı. Daha sonra, tüm plateler 32 °C’de ve 100 rpm şartlarında 12 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.

2.7. HPLC/MS/MS prosedürü

Birer fenolik olan quercetin, naringenin, chrysin ve Kafeik Asit Fenil Estere (CAPE) ait kromatografik ayırım işlemi HPLC metodu ile hypersigold kolon (50x4,6 mm, 1,9 µm partikül boyutu, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Mobil fazlar A: ultra saf su ve %1 formik asit; B: asetonitril ve %1 formik asit olacak şekilde ayarlandı. Çoklu konsantrasyon programı 0-1 dk %65-70 B; 1-3 dk %70-85 B; 3-5 dk %85-90 B; 5-8 dk %85-90 B ve 8-10 dk %95 B olacak şekilde tasarlandı. Her örnekten injeksiyon miktarı 20 µL ve akış hızı 300 µL/dk olacak şekilde ayarlandı ve pozitif iyon metodu ile kütle spektrometresi çalıştırıldı. İyon kaynak değerleri olarak; sprey voltajı 3,50 kV, kapiller sıcaklığı 320 °C’de, sheat gaz akışı 40, auxiliary gaz akışı 10 birim/ünite olacak şekilde ayarlandı. Kütle spektrometresi 250-310 m/z aralığında olacak şekilde belirlendi. Fenolik ve flavonoidler uygun spektral özelliklerinin ölçümü ile kütle aralığı, kesin kütle, spesifik parçalanma ve bulunma zamanlarına göre tanımlandı. Xcalibur yazılımı kullanılarak veri analizi yapıldı ve “www.mzcloud.org” sitesi örnek içerikleri için referans veri

bankası olarak kullanıldı. Miktar tayinleri örneklerin spesifik bulunma zamanı ve standartların kesin kütlesi ile kıyaslanarak, tam kütle araştırma tekniğine (±5 ppm) göre yapıldı [29].

2.8. DNA fragmentasyon analizi

Apoptozun doğal bir sonucu olan DNA fragmentasyonu deneyi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gerçekleştirildi. PC-3 ve HUVECs hücreleri deneysel gruplar bölümünde açıklandığı gibi hazırlandı. Daha sonra hücrelerden DNA izolasyonu mevcut kit protokolüne (G-Dex, Belgium) göre gerçekleştirildi. İzole edilen DNA’lar %1,5 lik Etidium Bromit içeren agaroz jelde Tris Asetat-EDTA tamponunda koşuruldu. DNA bantları ve fragmentleri GelDoc EZ (Bio Rad, USA) cihazıyla gözlemlendi.

2.9. İstatistiksel analizler

İstatistiksel sonuçlar one-way ANOVA metodunda Newman-Keuls çoklu karşılaştırma *Post-Hoc* Testlerine göre GraphPad Prism 5.01 programında analiz edildi. p<0,05 önemli olarak kabul edildi.

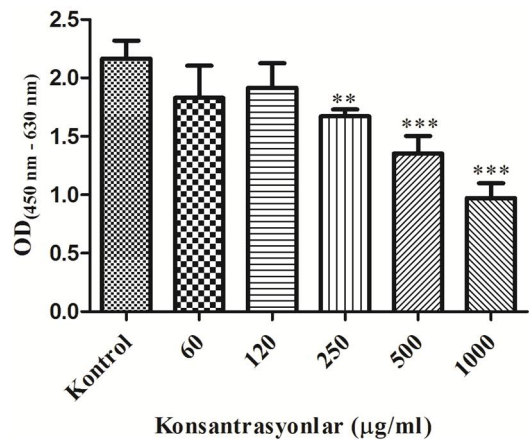
3. Bulgular

3.1. *A. gummifer*’e ait bazı fenolik bileşikler

A. gummifer çiçeğinin etanol özütünde bulunan fenoliklerin miktar tayinlerini tespit etmek üzere öncelikle bazı standartların HPLC/MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Tablo 1’ de görüldüğü gibi CAPE, Naringenin, Quercetin ve Chrysin fenoliklerine ait denklemler, tespit edilen moleküler ağırlıkları, hesaplanan miktarlar ve bulunma zamanları (RT) belirtilmektedir. CAPE bileşiği miktar ölçümünde diğer bileşiklere göre oldukça fazla gözlenirken, chrysin bileşiği az miktarda tespit edildi.

3.2. *A. gummifer*’ in PC-3 hücre canlılığı üzerine etkileri

Değişik dozlarda uygulanan *A. gummifer* çiçek özütünün PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkileri gözlemlendi. Şekil 1’de görüldüğü gibi kontrol grubundaki hücrelere göre 250, 500 ve 1000 µg/ml dozları uygulanan hücrelerde önemli ölçüde sitotoksik etki gözlemlenmektedir. 60 ve 120 µg/ml dozları ise istatistiksel olarak önemli bir etki göstermemektedir.



Şekil 1. Belirli dozlarda 24 saat boyunca uygulanan *A. gummifer*’in hücre canlılığı üzerine etkileri (Data ortalama ± SEM olarak ifade edildi. ** p<0,01 kontrole göre, *** p<0,001 kontrole göre, n=4).

Tablo 1. *A. gummifer* çiçeğinin etanol özütünde tespit edilen fenolik bileşikler

Bileşimin Adı	Denklem	Moleküler Ağırlığı [M+H]	Hesaplanan Miktar (µg/mg)	RT
Quercetin	$y = -3,68311e+006+222867*x \quad R^2 = 0,9990$	303,0499	45,164	2,20
Naringenin	$y = -1,52771e+007+149240*x \quad R^2 = 0,9895$	272,0757	114,428	2,09
CAPE	$y = 3,39873e+006+15839,2*x \quad R^2 = 0,9993$	285,1109	131,084	2,09
Chrysin	$y = 769815+1,30064e+006*x \quad R^2 = 0,9997$	255,0651	4,382	2,34

3.3. PC-3 ve HUVECs hücrelerinde ROS ve LPO oluşumu

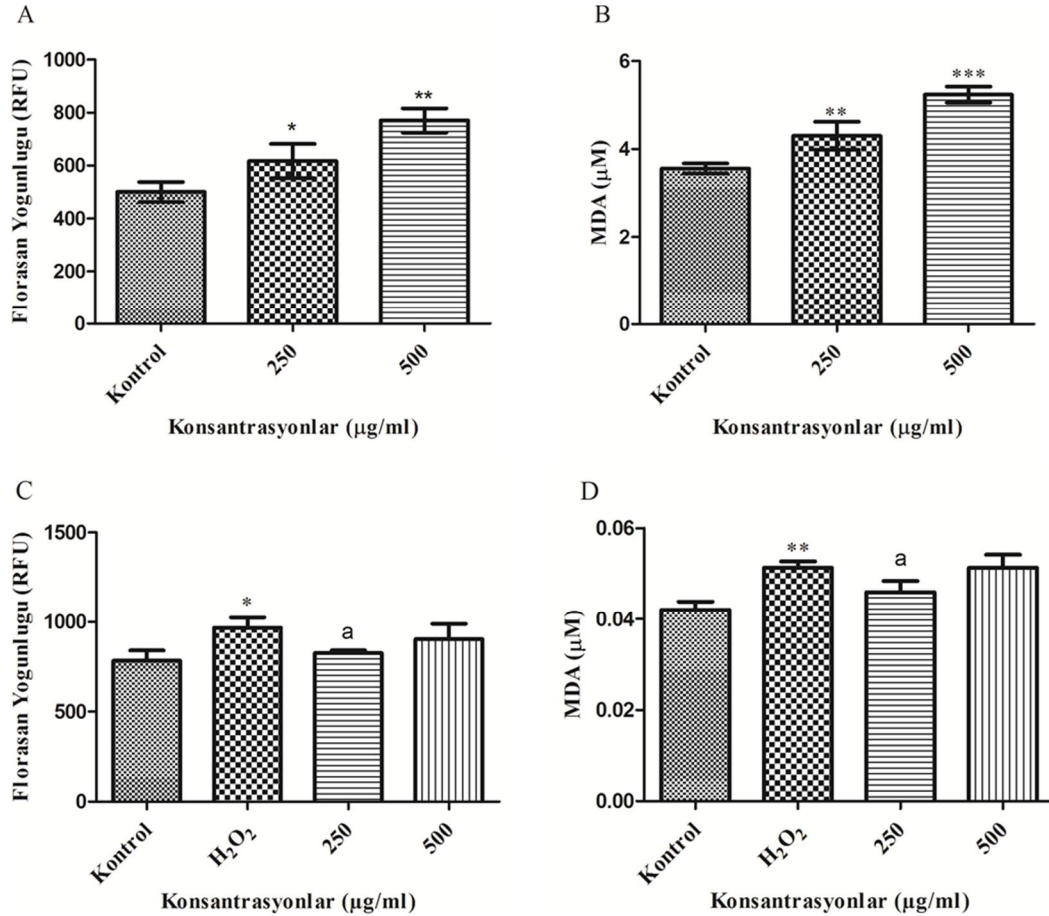
A. gummifer çiçek özütünün belirlenen en iyi iki dozunun hücrelerde ROS oluşumuna etkisini gözlemek için her bir grubun floresan şiddeti ölçümü yapıldı. Şekil 2A'da görüldüğü üzere uygulanan her iki dozdaki özüt, PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre ROS oluşumunu önemli ölçüde arttırmaktadır ($p < 0,05$ ve $p < 0,01$). Diğer taraftan H_2O_2 HUVECs hücrelerinde ROS üretimini artırıcı ajan olarak uygulanmış ve şekil 2C'de görüldüğü gibi H_2O_2 HUVECs hücrelerinde ROS miktarını kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttırmaktadır ($p < 0,05$). Ancak, 250 µg/ml *A. gummifer* çiçeği özütü H_2O_2 ile indüklenen hücelere uygulandığı zaman ROS oluşumunun H_2O_2 grubuna göre önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmektedir ($p < 0,05$).

Diğer bir parametre olarak MDA oluşumu LPO miktarının arttığının göstergesidir. ROS oluşumu LPO oluşumunu indüklemektedir. Şekil 2B'de görüldüğü gibi özütün uygulanan iki farklı dozu da PC-3 hücrelerinde

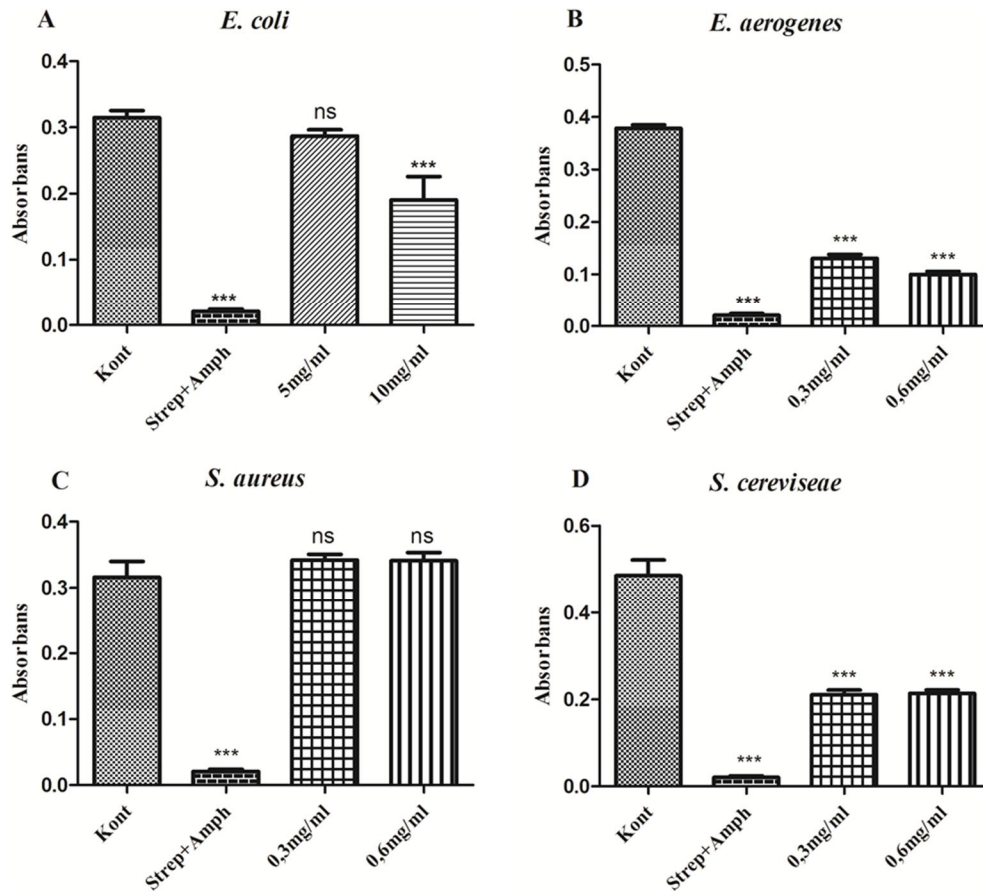
kontrol grubuna göre MDA oluşumunu arttırmaktadır ($p < 0,01$ ve $p < 0,001$). Ayrıca şekil 2D'de gösterilen sonuçlara göre, HUVECs hücrelerinin H_2O_2 ile muamele edilmesi bu hücrelerde kontrol grubuna göre LPO seviyesini önemli ölçüde arttırmaktadır ($p < 0,01$). Ancak, 250 µg/ml *A. gummifer* çiçeği özütü H_2O_2 ile indüklenen hücelere uygulandığında LPO seviyesini H_2O_2 grubuna göre önemli oranda düşürmektedir ($p < 0,05$).

3.4. *A. gummifer*'e ait anti-mikrobiyal aktivite

A. gummifer çiçeğinin etanol özütünün anti-mikrobiyal etkilerini gözlemek üzere ikisi Gram negatif, biri Gram pozitif ve diğeri bir maya olan mikroorganizmalar üzerinde gerekli testler yapıldı. Şekil 3A-B ve D'de görüldüğü üzere *A. gummifer* özütünün iki farklı Gram negatif bakterisi (*E. coli*, *E. aerogenes*) ile bir maya (*S. cerevisiae*) türüne karşı aktivite gösterirken, bir Gram pozitif bakteriye (*S. aureus*) karşı inaktif olduğu gözlemlendi (Şekil 3C).



Şekil 2. *A. gummifer* çiçek özütünün belirli iki dozunun ROS (A: PC-3 – C: HUVECs) ve LPO (B: PC-3 – D: HUVECs) üzerindeki etkileri. Hücreler deneysel hücre grupları bölümünde belirtildiği gibi ajanlar uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. (Data ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ kontrole göre, ** $p < 0,01$ kontrole göre ve *** $p < 0,001$ kontrole göre, ^a $p < 0,05$ H_2O_2 e göre, n=3).



Şekil 3. *A. gummifer* çiçek özütünün anti-mikrobiyal aktivitesi. Anti-mikrobiyal aktivite testleri özütün ve seçilen antibiyotiklerin mikroorganizmalara karşı çeşitli dozlarda uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Grafikler, (A) *E. coli*; (B) *E. aerogenes* Gram-negatif bakterilerini (C) *S. aureus* Gram-pozitif bakterisini; (D) *S. cerevisiae* mayasını göstermektedir. (Data ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. *** p<0,001 kontrole göre, ns kontrole göre önemsiz, n=3). Kont: Kontrol; Strep+Amph: Streptomisin and Ampisillin antibiyotik karışımı ve çeşitli dozlardaki *A. gummifer* çiçek dozları görülmektedir.

3.5. *A. gummifer*'in HUVECs ve PC-3 genomik DNA'ları üzerine etkileri

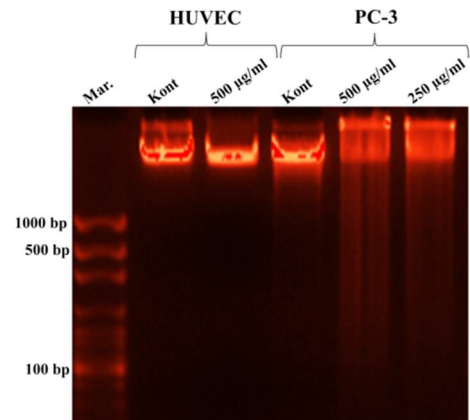
A. gummifer bitki özütünün apoptoza etkilerini gözlemleyebilmek amacıyla yapılan deneylerde apoptozun doğal bir sonucu olan DNA fragmentasyonu gözlemlendi. HUVECs hücrelerinde DNA fragmentasyonu hiç bir grupta gerçekleşmezken, PC-3 hücrelerinde *A. gummifer* bitki özütünün uygulandığı gruplarda oldukça yoğun bir şekilde fragmentasyon gözlemlenmektedir.

2. Tartışma ve sonuç

Önceki çalışmalarda *A. gummifer* türüne ait çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak PC-3 ve HUVECs hücrelerindeki direkt etkisi henüz tespit edilmemiştir. Bu çalışmamızda *A. gummifer* bitkisinin etanol özütünden kaynaklı hücre sitotoksitesi ve anti-mikrobiyal etkisi üzerine deneyler yürütülmüştür.

Diğer araştırmalarda oksidan miktarlarındaki artışın dokularda oksidatif strese ve oksidan savunma mekanizmasında hasara neden olduğu gözlemlenmiştir [30,31]. Oksidatif stresin apoptoz ve nekrozda hayati role sahip olduğu bilinmektedir. ROS ve LPO seviyelerinin oksidatif hasar vasıtasıyla değişerek hücre canlılığını ve apoptoz yolaklarını etkilediği tespit edilmiştir [30,31]. Aşırı şekilde artmış olan ROS miktarı oksidatif stresi indükleyerek apoptozun düzenlenmesinde rol almaktadır [30,31]. Ayrıca önceki çalışmaların sonuçları da, *A. gummifer*'e ait fitokimyasal bileşiklerin anti-oksidan özelliği sayesinde serbest radikallerin yakalanmasında ve ROS

üretiminin baskılanmasında etkili olduğunu göstermektedir [8,9]. Bu çalışmamızda *A. gummifer*'in HUVECs hücrelerinde H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif etkileri azalttığını gözlemledik. Ancak PC-3 hücrelerinde pro-oksidan özellik göstererek ROS ve LPO seviyelerinde artışa neden olmuştur. Bu da bu hücrelerde canlılığı azaltarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemiştir.



Şekil 4. *A. gummifer* çiçek özütünün HUVECs ve PC-3 hücrelerinde genomik DNA üzerine etkisi. DNA'lar %1,5 lik Etidium Bromit içeren agaroz jelde Tris Asetat-EDTA tamponunda koşuturuldu. DNA bantları ve Fragmentleri GelDoc EZ (Bio Rad, USA) cihazıyla gözlemlendi. (Kont= Kontrol; Mar= bilinen moleküler ağırlık ölçüleri ve çeşitli dozlardaki *A. gummifer* çiçek dozları görülmektedir).

Astragalus türlerinin çeşitli hastalıklar üzerinde biyolojik aktivitelerinin olduğu ve bu aktivitelerinin içerisindeki fitokimyasalların çeşitliliğine bağlı olarak değiştiği söylenmektedir [8,9,21,22]. Giriş bölümünde de bahsedildiği gibi *Astragalus* türlerinin quercetin ve naringenin gibi bazı önemli flavonoidlere sahip olduğu belirtilmektedir [15,16]. Bu çalışmamızda ise bunlarla birlikte güçlü anti-kanserojen etkiye sahip CAPE ve chrysin flavonoidlerinin [32] varlığı ve miktarları da tespit edildi.

Bu çalışmada aynı zamanda apoptozun doğal bir sonucu olan DNA fragmentasyonu da belirlenmiştir. *A. gummifer* bitki özütünün uygulandığı PC-3 hücre gruplarında oldukça yoğun bir şekilde fragmentasyon görülürken HUVECs hücrelerinde DNA fragmentasyonu gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara istinaden *A. gummifer* bitkisinin kanser hücrelerinde DNA'nın parçalanmasını indüklediği söylenebilir.

Önceki anti-mikrobiyal aktivite çalışmalarının sonuçlarında çeşitli *Astragalus* türlerinin farklı polaritedeki özütlerinin Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkilerinin olduğu gösterilmektedir [21]. Bunun aksine, bir diğer çalışmada ise yine çeşitli *Astragalus* türlerinin metanol ve hegzan özütlerinin anti-bakteriyel ve anti-fungal etkilerinin olmadığı ileri sürülmektedir [22]. Bu çalışmada *A. gummifer* çiçeği etanol özütünün iki farklı Gram negatif bakteri (*E. coli*, *E. aerogenes*) ile bir maya (*S. cerevisiae*) türüne karşı anti-mikrobiyal aktivite gösterirken, bir Gram pozitif bakteriye (*S. aureus*) karşı inaktif olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada *A. gummifer* çiçeklerinin etanol özütünün anti-mikrobiyal aktivitesi olduğu görüldü. Aynı zamanda, HUVECs hücrelerinde anti-oksidan özellik gösterirken PC-3 hücrelerinde pro-oksidan özellik gösterdiği tespit edildi. Bunlara ilaveten, PC-3 hücrelerinde apoptozla ilgili olarak DNA fragmentasyonu gözlemlendi. Bu nedenle *A. gummifer* çiçeğinin kanser hücrelerinde pro-oksidan etkiyle apoptozu artırmak suretiyle anti-kanser etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Teşekkür

A. gummifer türünün teşhis edilmesinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Lütfi BEHÇET'e teşekkürlerimizi sunarız.

Referanslar

- [1] Dinc M., Aytac Z., Dogu S. A new species of *Astragalus* (Fabaceae) from Turkey, *Turk. J. Bot.*, 37, 841-846, 2013.
- [2] Keskin C., Kaçar S. Fatty acid composition of root and shoot samples of some *Astragalus* L. (Fabaceae) taxa growing in the east and southeast of Turkey, *Turk J Biol*, 37, 122-128, 2013.
- [3] Wang D., Zhuang Y., Tian Y., Thomas G.N., Ying M., Tomlinson B. Study of the Effects of Total Flavonoids of *Astragalus* on Atherosclerosis Formation and Potential Mechanisms, *Oxid Med Cell Longev*, 1-10, 2012.
- [4] Cakilcioglu U., Turkoglu I. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazig-Turkey), *J Ethnopharmacol.*, 132, 165-175, 2010.
- [5] Yusufoglu H.S., Alam A., Zaghloul A.M., Al-salkini M.A., Alam P. Comparative anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Astragalus gummifer* labill herb and roots in rats, *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 11(3), 268-274, 2014.

- [6] Auyeung K.K., Cho C.H., Ko J.K. A novel anticancer effect of *Astragalus* saponins: Transcriptional activation of NSAID-activated gene, *Int. J. Cancer*, 125, 1082-1091, 2009.
- [7] Yejin W., Yanqun W. Inhibition of *Astragalus membranaceus* polysaccharides against liver cancer cell HepG2, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 2181-2183, 2010.
- [8] Ionkova I. Biotechnological approaches for the production of lignans, *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 57-68, 2007.
- [9] Ionkova I., Momekov G., Proksch P. Effects of cycloartane saponins from hairy roots of *Astragalus membranaceus* Bge., cultivated in bioreactor with respect to human tumor cell targets, *Fitoterapia*, 81, 447-451, 2010.
- [10] Linnek J., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Paululat C.T., Avunduk S., Alankus-Caliskan O., Lacaille-Dubois M.A. Cycloartane Glycosides from Three Species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helv Chim Acta.*, 94, 230-237, 2011.
- [11] Polat E., Bedir E., Perrone A., Piacente S., Alankus-Caliskan O. Triterpenoid saponins from *Astragalus wiedemannianus*, Fischer. *Phytochem.*, 71, 658-662, 2010.
- [12] Horo I., Bedir E., Perrone A., Ozgökçe F., Piacente S. Triterpene glycosides from *Astragalus icmadophilus*, *Phytochem.*, 71, 956-963, 2010.
- [13] Sevimli-Gür C., Onbaşlar I., Atilla P., Genç R., Çakar N., Deliloğlu-Gürhan I., Bedir E. In vitro growth stimulatory and in vivo wound healing studies on cycloartane-type saponins of *Astragalus* genus, *J. Ethnopharmacol.*, 134, 844-850, 2011.
- [14] Nalbantsoy A., Nesil T., Erden S., Çalış İ., Bedir, E. Adjuvant Effects of *Astragalus* Saponins Macrophyllsaponin B and Astragaloside VII, *J. Ethnopharmacol.*, 134, 897-903, 2011.
- [15] Jun Y.M., Kim E.H., Lim J.J., Kim S.H., et al. Variation of Phenolic Compounds Contents in Cultivated *Astragalus membranaceus*, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 20(6), 447-453, 2012.
- [16] Krasteva I., Nikolov S. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*, *Quim. Nova*, 31(1), 59-60, 2008.
- [17] Adiguzel A., Sokmen M., Ozkan H., Agar G., Gulluce M., Şahin F. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Methanol and Hexane Extract of *Astragalus* Species Growing in the Eastern Anatolia Region of Turkey, *Turk J Biol*, 33, 65-71, 2009.
- [18] Yu D.H., Bao Y.M., Wei C.L., et al. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus* Bunge, *Biomed Environ Sci*, 18, 297-301, 2005a.
- [19] Yu D.H., Duan Y.L., Bao Y.M., et al. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate, *J Ethnopharmacol*, 98, 89-94, 2005b.
- [20] Li X., He D.L., Zhang L., et al. A novel antioxidant agent, Astragalosides, prevents shock wave-induced renal oxidative injury in rabbits, *Urology Res*, 34, 277-282, 2006.

- [21] El Sebakhy N.A., Asaad A.M., Abdallah R.M., et al. Antimicrobial Isoflavans from *Astragalus* species, *Phytochemistry*, 36, 1387-1389, 1994.
- [22] Pistelli L., Bertoli A., Lepori E., et al. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*, *Fitoterapia*, 73, 336-339, 2002.
- [23] Tan B.K.H., Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs, *Curr Med Chem.*, 11, 1423-1430, 2004.
- [24] Bisignano G., Iauk L., Kirjavainen S., et al. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antibacterial activity of *Astragalus sicutus* Biv., *Int J Pharmacog*, 32, 400-405, 1994.
- [25] Calis I., Yuruker A., Tasdemir D., et al. Cycloartane Triterpene Glycosides from the Roots of *Astragalus melanophurrius*, *Planta Med*, 63, 183-1186, 1997.
- [26] Hou X., Tong Q., Wang W., Xiong W., Shi C., Fang C. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sciences*, 130, 38-46, 2015.
- [27] Shen H.M., Shi C.Y., Shen Y., Ong C.N. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1, *Free Radic Biol Med.*, 21(2), 139-146, 1996.
- [28] Smith M.T., Thor H., Hartzell P., Orrenius S. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, 31(1), 19-26, 1982.
- [29] Kečkeš S., Gašić U., Veličković T.C., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić Z. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem.*, 138, 32-40, 2013.
- [30] Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Etem E., Nedzvetsky V.S. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *J Pineal Res.*, 43, 225-31, 2007.
- [31] Upchurch G.R.Jr., Welch G.N., Fabian J.A., Freedman J.E., Johnson J.L., Keaney J.F.Jr., et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.*, 272,17012-17, 1997.
- [32] Vit P., Huq F., Barth O. M., Campo M., Pérez-Pérez E. M., Tomás-Barberán F. A., Santos E. L. Use of Propolis in Cancer Research, *BJMMR*, 8(2), 88-109, 2015.



Inhibitory effects of two kinds snake venom on sheep liver glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes activities

Mustafa Erat¹, Mehmet Ciftci*², Akcahan Gepdiremen³, Tavakkul Iskenderov⁴

Abstract

In vitro effects of snake venom on sheep liver glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), and glutathione reductase (GR) enzymes activities were investigated. G6PD, 6-PGD and GR enzymes were purified from sheep liver by 2', 5' ADP-Sepharose 4B affinity gel. The overall purifications were about 2,150; 1,240; and 1,678-fold, respectively. Temperature of +4°C was maintained during the purification processes. Enzymatic activities were spectrophotometrically measured according to Beutler, Carlberg and Mannervik methods at 340 nm. IC₅₀ values were determined from Activity% - [Snake venom] graphs. In addition, for the snake venom samples, protein concentrations were also determined.

Anahtar Kelimeler: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6-phosphogluconate dehydrogenase; glutathione reductase; sheep liver; snake venom

Koyun karaciğer glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfogluconat dehidrogenaz enzim aktiviteleri üzerine iki çeşit yılan zehirinin inhibisyon etkileri

Özet

Bu çalışmada koyun karaciğerinde saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfogluconat dehidrogenaz (6PGD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine yılan zehirinin etkileri *in vitro* olarak araştırıldı. Öncelikle G6PD, 6-PGD ve GR enzimleri 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırma katsayıları sırasıyla 2150, 1240 ve 1678 olarak bulundu. Saflaştırma esnasında sıcaklık +4°C'de kontrol altında tutuldu. Enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik olarak Beutler, Carlberg ve Mannervik metotlarına göre 340 nm'de tayin edildi. İnhibisyon etkisi gösteren yılan zehirleri için %Aktivite-[Yılan zehiri] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Ayrıca her bir yılan zehiri örneğinde protein tayini yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz; 6-fosfogluconat dehidrogenaz; glutatyon redüktaz; sheep liver; yılan zehiri

1. Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase EC 1.1.1.49; G6PD) is the first and key enzyme of the pentose phosphate metabolic pathway and it is widespread in all tissues and blood cells. G6PD reaction is an important site of metabolic control. This view is supported by several investigators who have shown variations in enzyme activity as a function of hormone and nutritional levels, enzyme quaternary structure and various metabolites including ADP, ATP, palmitoil-CoA, and spermidine. The enzyme catalyzes conversion of

D-glucose 6-phosphate to 6-phospho-D-gluconate in the presence of NADP⁺. 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-phospho-D-gluconate-NADP⁺ oxidoreductase EC 1.1.1.44; 6PGD) catalyzes the reversible oxidative decarboxylation of 6-phospho-D-gluconate to yield D-ribulose 5-phosphate and CO₂. The enzymes of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase are necessary for maintaining cellular integrity [1-4].

The pentose phosphate shunt occurs widely in living cells where one of its main functions is to provide the NADPH necessary for the synthesis of fatty acids and other specific reductions. NADPH producing in these reactions has been used in the reduction of the oxidized glutathione (GSSG) to the reduced form (GSH) as a coenzyme. This reaction is catalyzed by a flavo enzyme glutathione reductase (Glutathione: NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.8.1.7; GR). The reducing agent GSH is the most abundant low molecular weight thiol in almost all cells and is involved in a wide

¹ Atatürk University, Biotechnology Application and Research Center, Erzurum, Turkey

² Bingöl University, Arts and Science Faculty, Department of Chemistry, Bingöl, Turkey

³ Abant İzzet Baysal University, Medical Faculty, Department of Pharmacology, Bolu, Turkey

⁴ Ministry of Public Health of Baku, Azerbaijan

*Corresponding author E-mail: mciftci@bingol.edu.tr

range of enzymatic reactions [5]. GSH perform not only counteracting oxidative agents but also protecting sulfhydryl groups of intracellular proteins in the cells. Functions of GSH in reductive processes are essential for protein synthesis, regulation of enzyme, and protection of the cells against reactive oxygen species and free radicals generated in cellular metabolism [5]. On the contrary, increased GSSG concentration inhibits a number of important enzyme systems including protein synthesis [6]. Decreased GSH levels have also been reported in several diseases, such as acquired immune deficiency syndrome (AIDS) [7], Parkinson's disease [8], and diabetes [9].

2. Materials and methods

2.1. Materials

2', 5' ADP Sepharose 4B was obtained from Pharmacia. Sephadex G-200, NADP⁺, NADPH, GSSG, glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate, protein assay reagents were obtained from Sigma Chem. Co. All other used chemicals were analytical grade and obtained from either Sigma or Merck.

2.2. Preparation of the snake venom solutions

50 mg snake venom and 25 mg snake venom containing heavy metals were taken and those volumes were completed to 500 µl and 250 µl with distilled water, respectively.

2.3. Preparation of the homogenate

After livers were obtained from adult sheep, they were washed in isotonic saline containing 1 mM EDTA, and stored at -85 °C before use. 20 g of liver was first cut into small pieces and homogenized in a Waring blender with 50 ml of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM EDTA, 1mM DTT, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The homogenate centrifuged at 15.000 rpm for 60 min, and the precipitate was removed. This process was repeated two times and the supernatant was used as a crude extract. The crude extract was subjected to ammonium sulphate precipitation was brought among 30-70% saline saturation with solid (NH₄)₂SO₄. The precipitate was dissolved in a small amount of 50 mM K-phosphate buffer including 1 mM EDTA, pH 7.0 and then dialyzed at 4°C in the same buffer [10].

2.4. Purification of the enzymes

For the purification of G6PD, the ammonium sulphate fraction (30-70%) of the homogenate obtained previously was loaded on the 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column and the flow rate was adjusted to 20 ml/h. Then, the column was sequentially washed with 25 ml a buffer of 0.1 M K-acetate and 0.1 M K-phosphate, (pH 6.0) and 25 ml a buffer of 0.1 M K-acetate and 0.1 M K-phosphate (pH 7.85). The wash with the second buffer was continued until the final absorbance difference became 0.05. Elution of the enzyme was carried out with a mixture of 80 mM K-phosphate and 80 mM KCl and 0.5 mM NADP⁺ and 10 mM EDTA (pH 7.85). The enzyme activity was measured in all fractions, and the activity-containing tubes were pooled, then dialyzed in 50 mM K-acetate +50 mM K-phosphate buffer (500 ml, pH 7.0), for 2 h with two changes of buffer [11].

In order to purify 6PGD enzyme, G6PD's procedure was used expect that 0.5 mM NADP⁺ was added to the elution buffer (80 mM K-phosphate and 80 mM KCl and 5 mM NADP⁺ and 10 mM EDTA (pH 7.85)). All procedures were performed at 4°C [11].

To purify GR enzyme, the ammonium sulfate fraction (30-70%) of the homogenate was dissolved in and dialyzed against the buffer A (50 mM Tris-HCl including 1 mM EDTA, pH 7.5). Dialyzed sample was applied to a column of 2', 5'-ADP Sepharose 4B (1x10 cm) and the column was washed with buffer A. The enzyme held on the gel was eluted with a linear gradient of NADPH (0-1 mM) and GSH (0-0.5 mM) in buffer A. Active fractions were loaded onto a column of Sephadex G-200 (1.6x50 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7.5 (buffer B). After the enzyme was eluted by the same buffer, active fractions were collected and concentrated by liophilisator and stored at -85 °C by use [10,12].

2.5. Measurement of enzymes activity

G6PD and 6PGD activities were measured by Beutler's method [13]. One EU was defined as the enzyme reducing 1 µmol NADP⁺ per min at 25 °C and optimal pH (pH 8.0). GR activity was measured according to the method described by Carlberg and Mannervik [14] and one enzyme unit (EU) was defined as the enzyme reducing 1 µmol NADPH per min at 25 °C and optimal pH (pH 8.0).

2.6. Protein determination

Protein content in ammonium sulfate supernatant was quantified spectrophotometrically at 595 nm according to Bradford's method [15], with bovine serum albumin used as a standard.

2.7. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The control of enzymes purity was carried out using Laemmli's procedure with 3% and 8% acrylamide concentrations for running and stacking gel, respectively [16].

2.8. In vitro effects of snake venom

In order to determine the effects of snake venom on enzymes, some concentrations of snake venom (8.17, 40.85, 57.19, 81.7, and 122.55 mg/mL), and snake venom containing heavy metals (2.13, 4.26, 6.4, 8.52, 12.78, and 21.3 mg/mL), were added to separate tubes containing purified enzymes. The enzymes activities were measured in these tubes taking the tubes containing no snake venom as control (100% activity). The IC₅₀ values were obtained after activity in % was plotted vs. snake venom concentration.

3. Results

G6PD enzyme with a specific activity of 33.7 EU/mg proteins was purified a yield of 24% and a purification coefficient of 2,150. 6PGD enzyme with a specific activity of 26.8 EU/mg proteins was purified a yield of 18% and a purification coefficient of 1,240. GR enzyme with a specific activity of 54.5 EU/mg proteins was purified a yield of 16% and a purification coefficient of 1,678.

Figures 1, and 2, show the *in vitro* effects of the snake venom on the G6PD enzyme. IC₅₀ values were estimated from those figures as 0.968 mg/ml for snake venom, and 1.183 mg/ml for snake venom containing heavy metals, respectively. Figures 3, and 4, show the *in vitro* effects of the snake venom on the 6-PGD enzyme. IC₅₀ values were estimated from those figures as 0.639 mg/ml for snake venom, and 0.078 mg/ml for snake venom containing heavy metals, respectively. Figures 5, and 6, show the *in vitro* effects of the snake venom on the GR enzyme activity. IC₅₀

values were estimated from those figures as 0.355 mg/ml for snake venom, and 0.425 mg/ml for snake venom containing heavy metals, respectively.

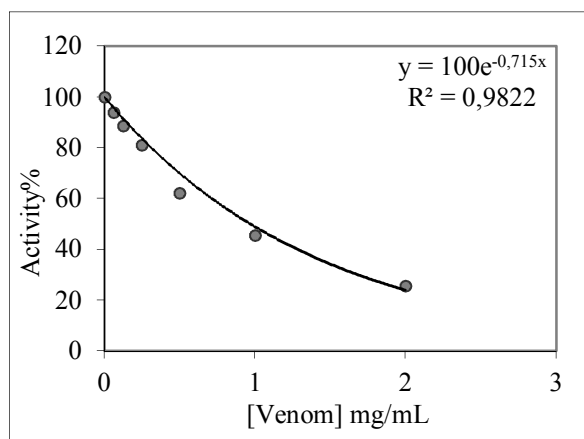


Figure 1. Activity (%) vs. snake venom concentration regression analysis graphs for G6PD in the presence of 6 different snake venom concentrations

In addition, for the snake venom and snake venom containing heavy metals samples, protein concentrations were also determined as 2.16 mg/ml and 2.28 mg/ml, respectively.

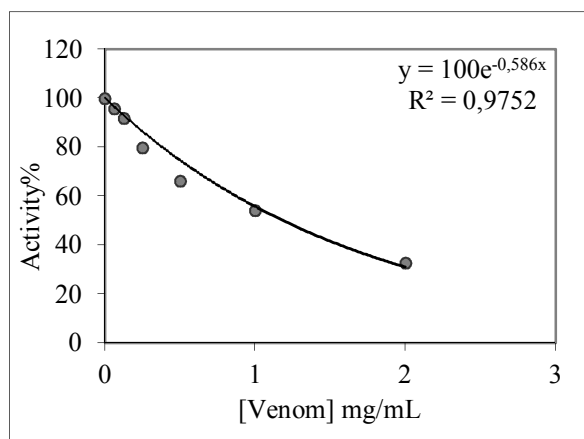


Figure 2. Activity (%) vs. snake venom containing heavy metals concentration regression analysis graphs for G6PD in the presence of 6 different snake venom containing heavy metals concentrations

4. Discussion

The formation of the reactive oxygen species (ROS) in cells leads to the formation of free radicals in metabolic processes. These harmful species causes damages in many molecules such as lipids, proteins and nucleic acids. These harmful effects are controlled by antioxidant defense system in cells. The most important molecule in antioxidant defense system in various tissues of the body is glutathione [17-21]. Furthermore, the enzymes such as GR, G6PD and 6PGD are necessary to remove these radicals and keep the cells stable. In normal conditions, the reductive and oxidative capacity of the cell (redox state) is in favor of oxidation [22-24]. However, ROS produced in oxidative stress are removed by antioxidant defense system. A number of drugs and chemicals increases the ROS/free radicals ratio in specific organs of the body Many researchers have determined that nicotine contributes ROS production [25-27].

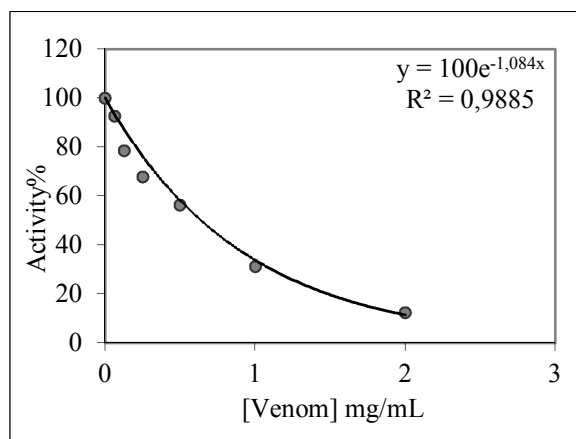


Figure 3. Activity (%) vs. snake venom concentration regression analysis graphs for 6-PGD in the presence of 6 different snake venom concentrations

Many drugs and chemicals have adverse or beneficial effects on human enzyme and metabolic events. For example, a diuretic drug, acetazolamide, inhibits carbonic anhydrase enzyme [28]. Inhibition of some important enzymes, which play key roles in a metabolic pathway, may result in pathologic conditions or disorders. G6PD, 6PGD and GR enzymes plays an important role in metabolism and have vital functions in tissues. Metabolic diseases such as diabetes mellitus affect some enzyme activities [29]. It is shown that a lot of chemicals and drugs inhibit G6PD, 6PGD and GR enzymes activities. For example, Ciftci *et al.* and Beydemir *et al.* have reported that some drugs have inhibited of erythrocytes G6PD [30-35] and 6PGD [36] and also, Erat *et al.* have reported that some drugs have inhibited the activities of GR of erythrocytes [37,38].

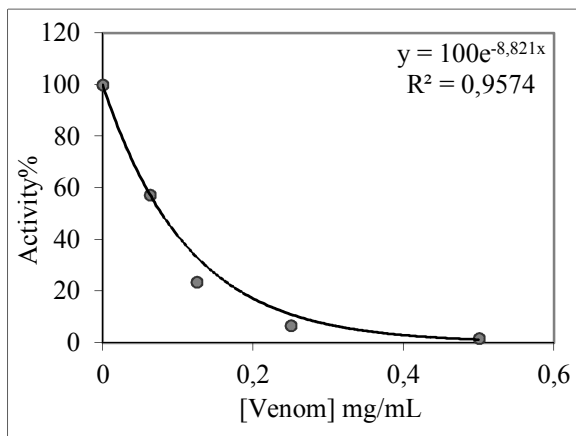


Figure 4. Activity (%) vs. snake venom containing heavy metals concentration regression analysis graphs for 6-PGD in the presence of 5 different snake venom containing heavy metals concentrations

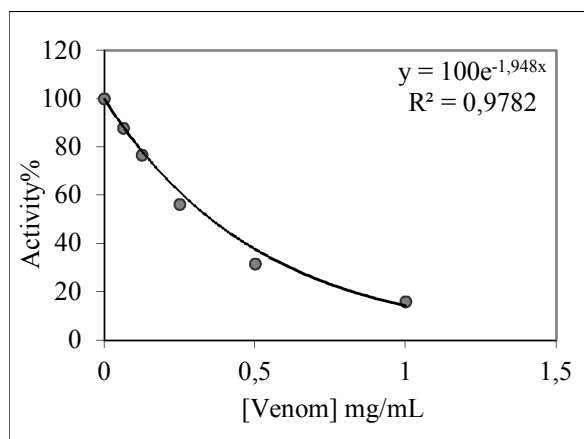


Figure 5. Activity (%) vs. snake venom concentration regression analysis graphs for GR in the presence of 7 different snake venom concentrations

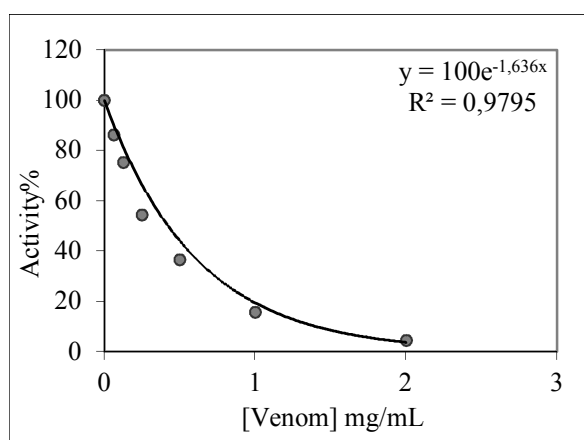


Figure 6. Activity (%) vs. snake venom containing heavy metals concentration regression analysis graphs for GR in the presence of 6 different snake venom containing heavy metals concentrations

5. Conclusion

In this study, the results showed that snake venom and metals containing snake venom inhibited the G6PD and 6PGD enzymes activities by ~74%, ~67% and ~87%, and ~100%, respectively. Also, venom and metals containing venom inhibited the GR enzyme activity by ~84%, and ~95% respectively. The IC₅₀ values of venom and metals containing venom are 0.968, 1.183 (G6PD); 0.639, 0.078 (6PGD); and 0.355, 0.425 mg/ml (GR) respectively. These results show that snake venom and metals containing snake venom being a potent inhibitor for erythrocytes G6PD, 6PGD and GR. 6PGD has smallest IC₅₀ value and was more inhibited by metals containing snake venom (IC₅₀: 0.078 mg/ml).

References

[1] Lehninger AL., Nelson DL., Cox MM., Principles of Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers Inc., New York, pp. 436-437, 1993

[2] Keha EE., Küfrevioğlu Öİ., Biyokimya. 2. ed., Aktif Yayınevi, İstanbul, pp. 439, 2000.

[3] Deutsch J., Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU and Bergmeyer J, Eds. Methods of

enzymatic analysis, Verlagsgesellschaft, VCH, (3), 190-196, 1983.

[4] Weksler BB., Moore A., Tepler J., Hematology, In: Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith LH, Jr. Eds. Cecil essentials of medicine, 2nd edn., Philadelphia, WB Saunders Company, 341-363, 1990.

[5] Meister A., Metabolism and functions of glutathione. TIBS, 1981, 6, 231-234.

[6] Deneke SM, Fanburg BL: Regulation of cellular glutathione. Am. J. Physiol., (257), 163-173, 1989.

[7] Akerlund B., Tynell E., Bratt G., Bielenstein M., Lidman CJ., N-acetylcysteine treatment and the risk of toxic reactions to trimethoprim-sulphamethoxazole in primary pneumocystis carinii prophylaxis in HIV-infected patients. Infect., (35), 143-147, 1997.

[8] Jenne P., Olanow., CW., Understanding cell death in Parkinson's disease. Ann. Neurol., (44), 72-84, 1998.

[9] Vijayalingam S., Parthiban A., Shanmugasundaram KR., Mohan V., Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabet Med., 1996, (13), 715-719.

[10] Trang NL., Bhargava KK., Cerami A., Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. Anal. Biochem., (133), 94-99, 1983.

[11] Ninfali P., Orsenigo T., Barociani L., Rapa S., Rapid purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. Prep. Biochem., (20), 297-309, 1990.

[12] Acan NL., Tezcan EF., Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. FEBS Lett., (250), 72-74, 1989.

[13] Beutler E., Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Ed. Beutler E, Academic Press, London, pp. 12, 1971.

[14] Carlberg I., Mannervik B., Glutathione reductase assay. Methods in Enzymol., pp. 484-495, 1985.

[15] Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, (72), 248-51, 1976.

[16] Laemmli DK., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, (227), 680-683, 1970.

[17] Ames BN., Shigenaga MK., Hagen TM., Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (90), 7915-7922, 1993.

[18] McCord JM., Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. Clin. Biochem., (26), 351-357, 1993.

[19] Bondy SC., Orozco J., Effects of ethanol treatment upon sources of reactive oxygen species in brain and liver. Alcohol Alcohol, (29), 375-383, 1994.

[20] Gul M., Kutay FZ., Temocin S., Hanninen O., Cellular and clinical implications of glutathione. Indian J. Exp. Biol., (38), 625-634, 2000.

[21] DeLeve LD., Kaplowitz N., Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. Pharmacol Ther., (52), 287-305, 1990.

- [22] Halliwell B., Gutteridge JM., Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed. Oxford, Clarendon Press. Pp. 86, 1-85, 1990.
- [23] Somani SM., Exercise, drugs and tissue specific antioxidant system. In SM, Somani (Ed.) Pharmacology in Exercise and Sports. Boca Raton, FL, CRC Press., 57-95, 1996.
- [24] Rubin E., The chemical pathogenesis of alcohol-induced tissue injury. Alcohol Health & Res. World, (17), 272-278, 1993.
- [25] Jenkins RR., Goldfarb A., Introduction: Oxidant stress, aging, and exercise. Med. Sci. Sports Exerc., (25), 210-212, 1993.
- [26] Guemouri L., Lecomte E., Herbeth B., Pirollet P., Paille F., Siest G., Artur Y., Blood activities of antioxidant enzymes in alcoholics before and after withdrawal. J. Stud. Alcohol., (54), 626-629, 1993.
- [27] Leanderson P., Tagesson C., Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. Chem. Biol. Interact., (81), 197-208, 1992.
- [28] Warnock DG., Diuretic agent. In: Katzung BG, ed. Basic and clinical pharmacology. 4th edn. USA, Appleton and Lange., 183-197, 1989.
- [29] Gupta BL., Nehal M., Baquer NZ., Effect of experimental diabetes on the activities of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catecholamines in rat erythrocytes of different ages. Indian J. Exp Biol., (35), 792-795, 1997.
- [30] Ciftci M., Kufrevioglu OI., Gundogdu M., Ozmen I., Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte Pharmacol. Res., (41), 109-113.
- [31] Ciftçi M., Ozmen I., Okuroglu ME., Pence S., Kufrevioglu OI., Effects of Metamizol and Magnesium Sulfate on Enzyme Activity of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo. Clinical Biochem., (34), 297-302, 2001.
- [32] Altıkat S., Ciftçi M., Buyukokuroglu ME., In vitro effects of some anesthetic drugs on human red blood cell glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme activity. Pol. J. Pharmacol., (54), 67-71, 2002.
- [33] Ciftçi M., Turkoglu V., Aldemir S., Effects of some antibiotics on glucose 6-phosphate dehydrogenase in sheep liver. Vet.Med.-Czech., (47), 283-88, 2002.
- [34] Beydemir S., Ciftçi M., Kufrevioglu OI., Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes, and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. J. Enz. Inh. and Med. Chem., (17), 271-277, 2002.
- [35] Ciftçi M., Demir Y., Özmen I., Atıcı O., In vivo effects of some plant hormones on rat erythrocyte carbonic anhydrase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities. J. Enz. Inh. and Med. Chem., (18), 71-76, 2003.
- [36] Ciftçi M., Beydemir S., Yılmaz H., Bakan E., Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from goose erythrocytes and kinetic properties. Pol. J. Pharmacol., (54), 275-280, 2002.
- [37] Erat M., Sakiroğlu H., Ciftci M., Effects of some antibiotics on glutathione reductase from bovine erythrocytes. Vet. Med–Czech, (48), 305-312, 2002.
- [38] Erat M, Ciftci M: In Vitro Effects of Some Antibiotics on Glutathione Reductase from Sheep Liver. J. Enz. Inh. and Med. Chem., (18), 545-550, 2003.



Aşırı öğrenme makineleri ile gürültülü EKG sinyallerinin sınıflandırılması

Mehmet Üstündağ*¹, Ömer Faruk Alçın¹, Ahmet Güner¹

Özet

Bu çalışmada, gürültülü EKG sinyallerinin sınıflandırılması için Aşırı Öğrenme Makineleri (AÖM) yöntemi önerilmiştir. Çalışmada AÖM'nin başarımını test etmek için Kaotik, Beyaz ve Flicker gürültüleri çeşitli Sinyal Gürültü Oranlarında (SGO) EKG sinyaline eklenmiştir. Temel istatistiksel parametreler kullanılarak gürültülü sinyallerden sekiz adet özellik çıkarılmıştır. Daha sonra bu özellikler kullanılarak AÖM ile sınıflandırılmaları yapılmıştır. Önerilen yöntemin başarımını test edebilmek için Yapay Sinir Ağları (YSA) ve Basit Lojistik Regresyon (BLR) ile karşılaştırması yapılmıştır. Yapılan benzetim çalışmalarının sonucunda AÖM'nin başarımının oldukça iyi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: EKG; gürültü; AÖM; YSA; BLR

Classification of noisy ECG signal using extreme learning machine

Abstract

In this study, Extreme Learning Machines (ELM) method has been proposed for the classification of noisy ECG signal. In the study to test the success of the ELM is chaotic, white and Flicker noise is added to the ECG signal in a variety of Signal to Noise Ratio. The eight features of noisy signals using basic statistical parameters were obtained. Then method using these features and classification were carried out. To test the performance of the proposed method has been compared with Artificial Neural Networks (ANN) and Simple Logistic Regression (SLR). The results of the simulation study on the performance of the ELM has proved to be quite good.

Keywords: ECG; noise; ELM; ANN; SLR

1. Giriş

Kalp rahatsızlıklarında, kalp ritimlerini tanımlayan en önemli biyomedikal sinyallerden birisi EKG sinyalidir [1]. EKG sinyali kalp ile ilgili hastalıkların tespitinde kardiyologlara yardımcı olmaktadır. Gürültü olarak isimlendirilen bozucu girişler bu tip biyomedikal sinyalleri de anlamsız hale getirebilmektedir. İstenmeyen farklı tiplerdeki bu gürültüler, kas gürültüsü, cihazdan kaynaklı gürültüler ve harici gürültüler olabilir [2]. Bozucu girişler sinyalin kalitesini azaltmakla birlikte bazen de sinyali tamamen bozabilmektedir.

Gürültü ve gürültünün arındırılması ile ilgili son yıllarda birçok yöntem önerilmiştir. Burada asıl önemli olan sinyale ekli olan gürültünün çeşidinin bilinmesidir. Aynı zamanda asıl sinyalinde ne tür özellikler gösterdiği bilinmelidir. Bu tür özellikler sinyalin durağan ya da durağan olmamasıyla alakalıdır. Sinyallerin durağan olup olmadığı tamamen istatistiksel parametreleriyle ilişkilidir. Sinyaller bu şekilde sınıflandırıldıktan sonra çözüm yöntemleri

belirlenir. Aynı şekilde gürültülerin de istatistiksel parametreleri birbirinden farklılık gösterebilir. Her gürültü için ve gürültülü sinyali gürültüden arındırabilmek için aynı yöntemler benzer başarımlar göstermezler. Bu sebeple gürültülerin sınıflandırılması aşırı önem arz etmektedir.

Bu alanda Chen ve Das otomatik gürültü tanımlama ile ilgili çalışmalar yapmışlardır [3]. Lee, Nagao ve Matsuyama ise bu metotlara temel teşkil edecek maksimum olasılık tabanında yerel standart sapmaları hesaplamışlardır [4-6]. Beaurepaire ve arkadaşları ise yerel histogramları kullanarak gürültüye ait istatistiksel parametreleri tahmin edip gürültüyü tanılamışlardır [7]. Vozel ve arkadaşları çoklu eşikleme yöntemi yoluyla denetimsiz sınıflandırma yapısını önermişlerdir [8]. Santhanam ve Radhika yeni bir yaklaşımla Geriye Yayılım Ağı ve Çok Katmanlı Algılayıcı kullanarak Beyaz Gaussian, beyaz olmayan Gaussian, Salt ve Pepper ekli gürültüleri sınıflandırmışlardır [9]. Shamik ve arkadaşları ise gürültüye ait istatistiksel özellikleri çıkartarak İleri Beslemeli Geriye Yayılım Sinir Ağı ile bazı gürültüleri sınıflandırmışlardır [10].

Bu makalede, biyomedikal sinyal olan ve kardiyologlar tarafından sıkça kullanılan EKG sinyaline çeşitli tiplerde

¹ Bingöl Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

*Sorumlu yazar E-posta: mustundag23@gmail.com

gürültüler eklenmiştir. Daha sonra sinyale çeşitli yollardan ve farklı SGO oranlarında bozucu giriş olarak gürültüler eklenmiştir. Elde edilen gürültülü EKG sinyallerinin özelliklerini çıkartabilmek için istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. Daha sonra bu özelliklerden faydalanarak AÖM ile sınıflandırılmaları yapılmıştır. Yapılan benzetim çalışmalarının sonucunda başarımın oldukça iyi olduğu görülmüştür.

2. Özellik çıkarma

Ortalama, median (ortanca), standart sapma, varyans ve momentler gibi istatistiksel fonksiyonlar çoğu uygulamalarda özellik çıkarma için kullanılır [11-13]. Ortalama ve varyans gibi istatistiksel fonksiyonlar, verilerin dağılımı, yayılımı ve değişkenliği ile birlikte histogramdaki veri dağılımları veri sayısı ile ilgili bilgilerin elde edilmesine yardımcı olur [10].

Bu çalışmada, gürültülü EKG sinyaline ait özellik matrislerini oluşturabilmek için 8 istatistiksel fonksiyon (RMSE, Standart Sapma, Max, Min, Ortalama, Varyans, Çarpıklık ve Basıklık) kullanılmıştır. Bu istatistiksel fonksiyonlar ve bunlara ait eşitlikler aşağıda verilmişlerdir [14-17].

Özellik (1): RMSE (Root Mean Square Error-Ortalama Kare Köklerin Hatası) tahmin edilen değerler ile gözlenen değerler arasındaki farklar standart sapmayı temsil etmektedir.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{1,i} - x_{2,i})^2}{n}} \quad (1)$$

Özellik (2): Standart Sapma; merkezi değişim ölçülerinden biridir ve veri noktalarının ortalamadan ne kadar saptığını gösterir.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (2)$$

Özellik (3,4): Maksimum ve minimum ise veri vektörünün içindeki en büyük ve en küçük verileri buldurur.

Özellik (5): Ortalama; merkezi eğilim ölçülerinden biri olan ortalama, veri kümesindeki değerler için kütle merkezi ve denge noktasını gösterir.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (3)$$

Özellik (6): Varyans; veri değerlerinin ne ölçekte veya ne derecede yaygın olduklarını tanımlayan istatistiksel bir parametredir.

$$V = \frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{X})^2}{n} \quad (4)$$

Özellik (7): Çarpıklık; verilerin simetrik olmayacak şekilde dağılımını gösterir. Simetrik bir dağılımda katsayı

sıfır olur, sağa çarpık bir dağılımda pozitif değer alırken sola çarpık bir dağılımda ise negatif değer alır.

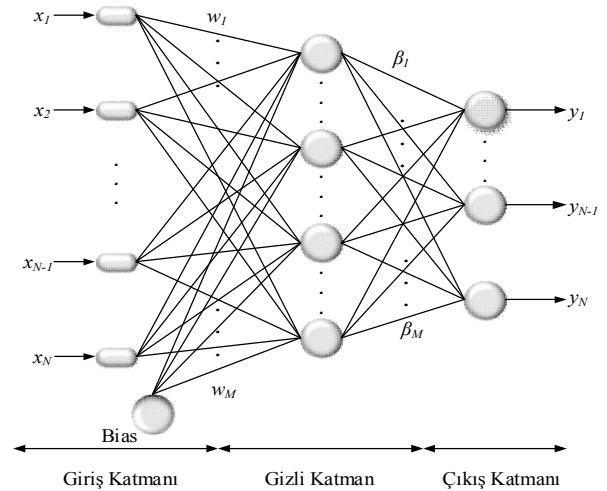
$$C = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^3 / n}{S^3} \quad (5)$$

Özellik (8): Basıklık; basıklık katsayısı, verilerin basıklığı veya sivrililiğini göstermektedir.

$$B = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^4 / n}{S^4} \quad (6)$$

2.1. Aşırı öğrenme makinası

Öğrenme algoritmalarından biri olan AÖM, TGKİB (Tek Gizli Katmanlı İleri Beslemeli) bir sinir ağı modelidir [18-20]. AÖM'nin İleri Beslemeli Ağlardan farkı giriş ağırlıklarının ve gizli katman eşik değerlerinin rastgele üretilerek sabit kalmasıdır. Çıkış ağırlıkları ise en küçük kareler metodu kullanılarak hesaplanır. AÖM geleneksel İleri Beslemeli Ağlar ile karşılaştırıldığında iyi bir genelleme başarımı ve hızlı öğrenme süreci sağladığı görülmektedir. Şekil 1'de Tek Gizli Katmanlı İleri Beslemeli ağ yapısı verilmiştir [18-20].



Şekil 1. TGKİB ağ yapısı

Şekil 1'de gösterilen TGKİB ağ yapısı için bir giriş/çıkış $(x_i = [x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in}]^T, y_i = [y_{i1}, y_{i2}, \dots, y_{in}]^T)$ ikilisi olsun. N tane gizli katman nörona ve $g(x)$ aktivasyon fonksiyonuna sahip bu ağ yapısına ait eşitlik Denklem 7'de verilmiştir [18-20].

$$\sum_{i=1}^M \beta_i g(w_i \cdot x_j + b_i) = o_j, j = 1, \dots, N \quad (7)$$

Bu eşitlikte, $w_i = [w_{i1}, w_{i2}, \dots, w_{in}]^T$ giriş ağırlık vektörünü, $\beta_i = [\beta_{i1}, \beta_{i2}, \dots, \beta_{im}]^T$ çıkış katmanı ağırlık vektörünü, b_i i'ninci gizli sinir hücresinin eşik değerini ve $o_j = [o_{j1}, o_{j2}, \dots, o_{jn}]^T$ ise TGKİB ağına ait çıkışı göstermektedir. TGKİB ağının sıfır hataya yakınsadığı eşitlik Denklem 8'de verilmiştir.

$$\sum_{i=1}^M \beta_i g(w_i \cdot x_j + b_i) = y_j, j = 1, \dots, N \quad (8)$$

Denklem 8’de verilen eşitlik, Denklem 9’da gösterildiği gibi matris formunda yazılabilir.

$$Y = H\beta \quad (9)$$

Bu eşitlikte verilen H gizli katman çıkış matrisini, β çıkış katmanı ağırlıklarını gösterirken Y ise çıkış vektörünü belirtmektedir. H , β ve Y ifadelerine ait eşitlik Denklem (10)’da verilmiştir.

$$H = \begin{bmatrix} g(w_1 \cdot x_1 + b_1) & \cdots & g(w_N \cdot x_1 + b_N) \\ \vdots & \cdots & \vdots \\ g(w_1 \cdot x_M + b_1) & \cdots & g(w_N \cdot x_M + b_N) \end{bmatrix}_{N \times M} \quad (10)$$

$$Y = \begin{bmatrix} y_1^T \\ \vdots \\ y_N^T \end{bmatrix}_{N \times 1}, \beta = \begin{bmatrix} \beta_1^T \\ \vdots \\ \beta_M^T \end{bmatrix}_{M \times 1}$$

$$\beta = H^\dagger Y \quad (11)$$

Denklem (Z)’de H^\dagger gösterimi H ’ın Moore Penrose genelleştirilmiş tersini belirtmektedir [18-20]

3. Gürültülü EKG sinyalinde gürültülerin sınıflandırılması benzetim çalışması

Bu makalede, gürültü EKG sinyali için sınıflandırma çalışması yapılmıştır. Algoritma, gürültü ile bozulmuş sinyallere ait gürültü türünü belirlemek için kullanılır. Gürültü karışmış sinyale ait eşitlik Denklem 12’de verilmiştir.

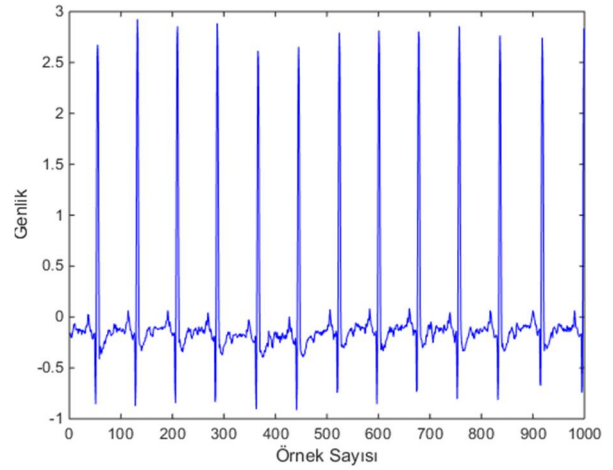
$$y[n] = x[n] + d[n] \quad (12)$$

Bu eşitlikte $x[n]$ asıl sinyali, $d[n]$ sinyale karışmış gürültüyü ve $y[n]$ ise gürültülü sinyali ifade etmektedir.

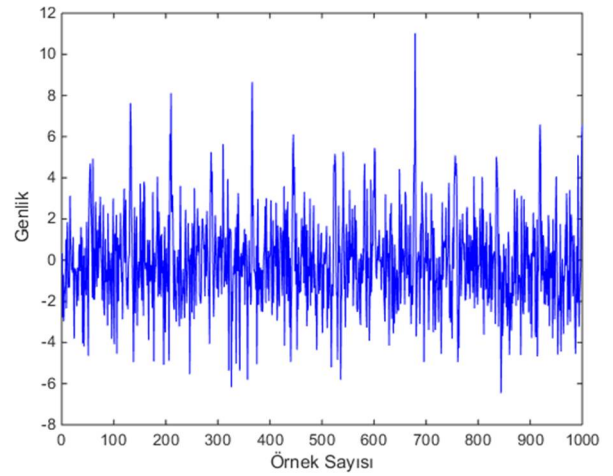
Bu çalışmada asıl sinyal olarak Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology veri tabanından EKG sinyalleri elde edilmiştir [21]. Bu sinyale ait örnek sayısı 7680’dir. Gürültüsüz EKG sinyaline ait 1000 örnek için grafik Şekil 2’de verilmiştir. Beyaz, Flicker (pembe) ve kaotik gürültüler eklenmiş -10dB SGO değerindeki EKG sinyalleri sırasıyla Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5’de gösterilmiştir.

Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5’den açıkça görüleceği gibi gürültü eklenmiş sinyaller orijinal sinyalden çok farklı biçimdedir.

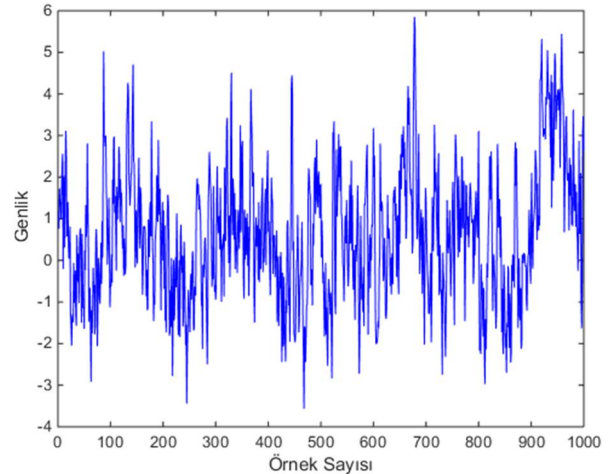
Önerilen yöntemin başarımını göstermek amacıyla 5, 0, -5, -10, -15 -17, -20 -25dB SGO değerleri dikkate alınarak Beyaz gürültü, Flicker gürültü ve Kaotik gürültü eklenmiş sinyallerden her birinden 100 adet üretilerek 300 örneğe sahip 8 adet veri seti hazırlanmıştır. Hazırlanan veri setlerinden Bölüm 2’de verilen 8 adet istatistiksel parametre kullanılarak özellik çıkarılmıştır. Bu özellikler AÖM kullanılarak sınıflandırılmıştır. AÖM gizli katman nöron sayısı 13 ve aktivasyon fonksiyonu *Sigmoid* olarak deneye dayalı yaklaşımla belirlenmiştir. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir. Tablo 1’de Süre, eğitim ve test için harcanan toplam süreyi göstermektedir. Tablo 1 incelendiğinde -15dB’e kadar %100 başarımla elde edilmiştir. Önerilen yaklaşım ile -25dB değeri için bile kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir.



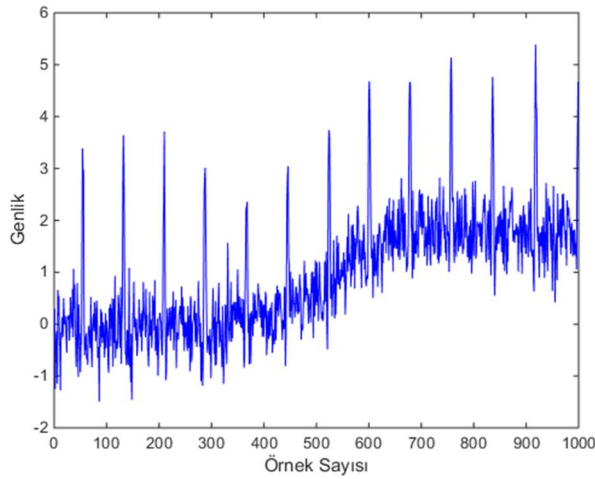
Şekil 2. EKG sinyali



Şekil 3. Beyaz gürültü eklenmiş EKG sinyali



Şekil 4. Flicker gürültü eklenmiş EKG sinyali



Şekil 5. Kaotik gürültü eklenmiş EKG sinyali

Tablo 1. Deneysel çalışma AÖM sonuçları

AÖM		
SGO (dB)	Başarım (%)	Süre (sn)
5	100	0,0016
0	100	0,0047
-5	100	0,0016
-10	100	0,0031
-15	99,333	0,0016
-17	94	0,0010
-20	94,667	0,0016
-25	93	0,0016

Önerilen yaklaşımın başarım geçerliliğini test etmek amacıyla sınıflandırmada yaygın olarak kullanılan YSA ve BLR ile aynı şartlarda karşılaştırma yapılmıştır. İki gizli katmanlı ve her katmanda 10 nöronlu YSA mimarisi seçilmiştir. YSA'nın gizli katmanlarında ve çıkış katmanında sırasıyla tanjant sigmoid ve doğrusal aktivasyon fonksiyonları kullanılmıştır. YSA mimarisi *Scaled conjugate gradient backpropagation* algoritması ile eğitilmiştir. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 2. AÖM ile YSA karşılaştırma sonuçları

SGO (dB)	AÖM		YSA		BLR	
	Başarım (%)	Süre (sn)	Başarım (%)	Süre (sn)	Başarım (%)	Süre (sn)
5	100	0,0016	100	0,125	100	0,03
0	100	0,0047	100	0,121	99,667	0,04
-5	100	0,0016	100	0,772	100	0,04
-10	100	0,0031	66,667	0,114	99,667	0,04
-15	99,333	0,0016	64,334	0,804	98,333	0,04
-17	94	0,0010	73,667	0,977	95,667	0,07
-20	94,667	0,0016	77,667	1,057	93,333	0,04
-25	93	0,0016	83,667	0,897	92,667	0,19

Tablo 2'den görüldüğü -5dB SGO değerine kadar YSA %100 başarım değerine sahipken bu değerden sonra iyi bir başarım gösterememiştir. Başarım açısından AÖM YSA'dan daha üstün olduğu Tablo 2'den görülmektedir. Aynı

zamanda, süre açısından da AÖM'nin çok daha iyi değerlere sahip olduğu görülmektedir. BLR yöntemi sınıflandırma başarımı ve süre açısından YSA'dan daha iyi performans gösterirken AÖM'nin gerisinde kalmaktadır.

4. Sonuçlar ve öneriler

Bu makalede, gürültüye maruz kalmış EKG sinyallerinde gürültü türlerini belirleyebilmek için sınıflandırma çalışması yapılmıştır. Gürültülü sinyallerden temel istatistiksel parametrelere dayalı özellikler çıkarılmış ve bu özellikler AÖM ile sınıflandırılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda düşük SGO değerlerinde bile yüksek başarım elde edildiği gösterilmiştir. YSA ve BLR yöntemleri kullanılarak önerilen yaklaşımın başarım geçerliliği test edilmiştir. Önerilen yöntem ile, daha az sürede daha yüksek başarım gösteren bir gürültü sınıflandırma yapılmıştır.

Kaynaklar

- [1] Borries, R.V., Pierluissi, J. H., and Nazeran, H., Redundant Discrete Wavelet Transform for ECG Signal Processing, Biomedical Soft Computing and Human Sciences, Vol.14,No.2,pp.69-80, 2009.
- [2] Wu, Y., Rangayyan, R.M., Zhou, Y., and Ng, S.C., Filtering electrocardiographic signals using an unbiased and normalized adaptive noise reduction system, Medical Engineering & Physics, vol.31, no.1, pp.17-26, 2009.
- [3] Chen, Y. and Das, M., An automated technique for image noise identification using a simple pattern classification approach, Proceedings of MWSCAS 07, IEEE Computer Society, USA., PP:819-822, 2007.
- [4] Lee, J.S., Digital image smoothing and the sigma filter, Computer Graphics and Image Processing, no 24, pp. 255-269, 1983.
- [5] Lee, J.S., Speckle analysis and smoothing of synthetic aperture radar images, Computer Graphics and Image Processing, Vol no. 17, pp.24-32, 1981.
- [6] Nagao, M., Matsuyamat, T., Edge preserving smoothing, Computer Graphics and Image Processing, no 9, pp. 394-407, 1979.
- [7] Beaufrepaire, L., Chehdi, K. and Vozel, B., Identification of the nature of noise and estimation of its statistical parameters by analysis of local histograms, Proc. 1997 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, Vol. 4,pp. 2805-2808, 1997.
- [8] Vozel, B., Chehdi, K., Klaine, L., Lukin, V.V., and Abramov, S.K., Noise identification and estimation of its statistical parameters by using unsupervised variational classification, Proceedings of the IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, May 14-19, IEEE Xplore Press, Toulouse, pp: 841-844, 2006.
- [9] Santhanam, T., and Radhika, S., A novel approach to classify noises in images using artificial neural network, Journal of Computer Science, 6 (5): pp. 541-545, 2010.
- [10] Tiwari, S., Singh, A. K., and Shukla, V.P., Statistical Moments based Noise Classification using Feed Forward Back Propagation Neural Network, International Journal of Computer Applications, 18(2):36-40, 2011.

- [11] Devendran V., et. al., Texture based Scene Categorization using Artificial Neural Networks and Support Vector Machines: A Comparative Study, ICGST-GVIP, Vol. 8, Issue IV, pp. 45-52, 2008.
- [12] Said E. E., et al., Neural Network Face Recognition Using Statistical Feature Extraction, 17th National Radio Science Conference, Minufiya University, Egypt, C31, pp. 1-8, 2000.
- [13] Li L., et al., Statistical modeling of complex backgrounds for foreground object detection, IEEE Trans. Image Proc., 13(11), pp. 1459-1472, 2004.
- [14] Tekin, V., İstatistiğe Giriş. Seçkin Yayınları, 327s, Ankara, 2006.
- [15] Ross, M.R., Olasılık ve İstatistiğe Giriş, Nobel Yayınları, 647s, Ankara, 2012.
- [16] Olgun, M.O., Özdemir, G., İstatistiksel özellik temelli bayes sınıflandırıcı kullanarak kontrol grafiklerinde örüntü tanıma. Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Vol: 27, No: 2, 303-311, 2012.
- [17] Internet: <https://tr.wikipedia.org/>.
- [18] Huang, G. B., Zhu, Q. Y., ve Siew, C. K., Extreme learning machine: theory and applications, Neurocomputing, 70(1), 489-501, 2006.
- [19] Alçın, Ö. F., Şengür, A. ve İnce, M. C., İleri-geri takip algoritması tabanlı seyrek aşırı öğrenme makinesi, Journal of the Faculty of Engineering & Architecture of Gazi University, 30(1), 126-132, 2015.
- [20] Huang, G. B., Zhu, Q. Y., ve Siew, C. K., Extreme learning machine: a new learning scheme of feedforward neural networks, IEEE International Joint Conference on Neural Networks, Budapest, 25-29 July, 2, 985-990, 2004.
- [21] Internet: Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology, <http://ecg.mit.edu/>.



An experimental investigation of effect of turning AISI 1040 steel at low cutting speed on tool wear and surface roughness steel

Ali Erçetin*¹, Üsâme Ali Usca¹

Abstract

In this study, the effect of different cutting speeds on cutting tool wear and surface roughness was investigated in turning operation. Cylindrical bars of AISI 1040 steel was selected as workpiece materials during this investigations in turning process. The K type coated CVD (Chemical Vapor Deposition) TiAlN ceramic tungsten carbide cutting tools were used in turning of bars. Surface roughness of turned bars and tool wear were accepted as criteria for performance evaluation of these cutters. Tool wear was determined by performing SEM (scanning electron microscopy) and EDX (Energy Dispersive X-ray spectroscopy) analyses after conducting other experimental studies at a constant feed rate. Surface roughness values were also measured after every turning process. The aim of this study was to investigate the influence of cutting speed, especially low cutting speed on tool wear and surface roughness. According to experimental results, decreasing of cutting speed forces the cutting tool more and increasing of cutting speed not only causes more coating wear, but also increase radius of cutting nose. However, the best surface roughness could be obtained in turning process for max cutting speed.

Keywords: Turning; tool wear; surface roughness; SEM; AISI 1040

AISI 1040 çeliğinin düşük kesme hızında tormalanmasının takım aşınması ve yüzey pürüzlülüğüne etkisinin deneysel incelenmesi

Özet

Bu çalışmada, tormalama işleminde farklı kesme hızlarının kesici takım aşınması ve yüzey pürüzlülüğüne etkisi incelenmiştir. Tormalama prosesinin bu araştırma esnasında, çalışma malzemesi olarak AISI 1040 çeliğinden miller seçilmiştir. Millerin tormalanmasında K tipi CVD kaplanmış TiAlN seramik tungsten karbür kesici takımlar kullanılmıştır. Bu kesicilerin performans değerlendirmesinde tormalanmış millerin yüzey pürüzlülüğü ve takım aşınması kriter olarak kabul edilmiştir. Diğer deneysel çalışmalara değindikten sonra takım aşınması SEM ve EDX analizleri ile belirlenmiştir. Yüzey pürüzlülük değerleri her tormalama döngüsünden sonra ölçülmüştür. Bu çalışmanın amacı kesme hızının etkisinin, özellikle düşük kesme hızının takım aşınması ve yüzey pürüzlülüğüne etkisinin araştırılmasıdır. Elde edilen sonuçlara göre; kesme hızının düşürülmesi kesici takımı daha çok zorlamakta ve kesme hızının artışı kaplamanın daha çok aşınmasına ve kesici uç yarıçapının artmasına neden olmuştur. Fakat, en iyi yüzey pürüzlülüğü maksimum kesme hızındaki tormalama işleminde elde edilebilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tormalama; takım aşınması; yüzey pürüzlülüğü; SEM; AISI 1040

1. Introduction

Nowadays, machinability of steels has an important place in engineering industries. Engineering industries have competed with each other by working to obtain min production price and max production speed at machinability of steels. Operating of cutting tools at larger depth of cut and higher machining speeds causes higher working temperature and tool failure rate. Application of machinability methods has importance to learn machinability characterization of every material [1-4]. Gear wheels, shaft bearings, cylindrical system pieces which are working in contact with each other can be manufactured through machinability method.

Decreasing of wear situation and good surface quality in these pieces are wanted [5, 6]. Many factors affect surface roughness such as continuous or intermittent machining, tool geometry, cutting speed, depth of cut, feed rate, type of workpiece, rigidity of holder and machine tool [1].

Surface deformation, fast worn and broken of cutting tools can be encountered after using coated or uncoated cutting tool and choosing wrong turning parameters when trying to obtain certain surface roughness values [7-11]. Titanium based coatings like TiN, TiC, TiCN ve TiAlN and aluminium based ceramic coatings like Al₂O₃ are especially preferred because of good performance during cutting process [4, 12]. Among the types of coatings for cutting tools, TiN/Al₂O₃ coating is one of the most wear resistant coatings [2, 13] and also increase the cutting toughness of

¹ Bingöl University, Faculty of Engineering and Architecture, Mechanical Engineering, 12000 Bingöl, Turkey

*Corresponding author E-mail: aliercetin@bingol.edu.tr

the tools [2]. TiN coatings decrease the friction coefficient, increase hardness and improve wear resistance [2, 14, 15]. Developments in ceramic machining technology were concluded as properties like strength, toughness, thermal shock resistance, hardness and wear resistance of new generation high performance cutting tools. For this reason, ceramic tools are used to machining typical steels and hard materials [16]. There are different classifications of tool wear in metal cutting process like abrasion, adhesion, fatigue, diffusion, chemical wear [16, 17].

Hardness of workpiece, composition and type of cutting tool in turning alongside tool geometry factors which effects wear mechanism [16, 18]. Another important factors which effect tool wear are continuous and intermittent cutting types in turning. Applied intermittent turning results by using cementite carbide cutting tool showed that wear type is usually flank wear and wear mechanism are abrasion, adhesion and oxidation [16, 18]. Literature studies determined that increase at cutting speed caused to wear cutting tool in a short time while making a good surface quality. But increase at feed rate provided for less tool wear while causing bad surface quality [5, 6, 11, 19, 20]. Decreasing of surface roughness values and tool wears were wanted so turning processes of chosen workpiece were realized by choosing coated cutting tool [11, 16, 20].

Various other studies about machinability of steels and surface roughness were done. Obtained surface roughness were investigated as a result of turning AISI H13 hot work steel at different machining condition (cutting speed and feed rate) with using coated cementite carbide cutting tool. Better surface quality at 0.05 mm/rev were determined in contrast with other surface qualities at 0.10 and 0.15 mm/rev [19]. According to various coating material, showing different roughness values of machined surface and influence of change of cutting speed and feed rate values on surface quality were specified [20]. Influences of cutting tool chip angle on surface roughness were investigated by using AISI 1040 steel. Increase at surface quality with positive chip angles was expressed and bad influence of negative chip angle on surface roughness was determined [21].

In this study, influence of different cutting speed on tool wear and surface quality was investigated in turning process of AISI 1040 steel at constant feed rate with using coated cutting tool. Furthermore, relation of chip varieties with cutting speed and surface roughness, consisted failures of cutting tool at low cutting speed and influence on surface roughness of workpiece were determined after turning process. As a result, choosing low cutting speed can cause to damage cutting tool so fast.

2. Material and method

Iranian Tos TN50 model universal turning machine with a spindle drive motor of 5.5 kW and 2000 rpm maximum speed was used in the experiments. Cylindrical bars of AISI 1040 steel materials, each measuring 500 mm long and 80 millimeters (mm) in diameters, were used as test specimens. They were turned with ceramic carbide cutting tool in dry condition. Chemical composition properties of turned bar are given in Table 1, mechanical properties are given in Table 2.

Table 1. Chemical composition of AISI 1040 steel (% Weight)

C	Si	Mn	S	P
0.41	0.36	0.72	0.036	0.032

Table 2. Mechanical properties of AISI 1040 steel

Hardness (HV)	Yield Point (MPa)	Tensile Strength (MPa)	Breaking Strain (%)	Elasticity Modulus (GPa)
158	400	630-780	31.8	190-210

Turning processes were realized at cutting speed for $V_c=31, 126, 179$ m/min, feed rate of $f=0.12$ mm/rev and depth of cut of $a_p=1$ mm as 1. turning, 2. turning and 3. turning processes. Cutting tools had cut chips from workpiece along 500 mm bar length in each turning process. But the tool used in third turning process at 31 m/min cutting speed was damaged at 428 mm bar length so other two tools were used for turning until the same length (428 mm). It can be seen as schematic representation in Figure 1.

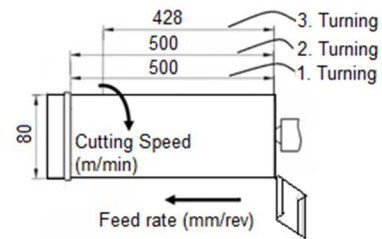


Figure 1. Schematic representation of turning process

TiAlN coated tungsten carbide (WC) ceramic cutting tool in P30 quality, had 92 HRC hardness values and CKJNR 2525 M16 type of tool holder were used in turning AISI 1040 steel. Geometric properties of cutting tool are given in Figure 2.

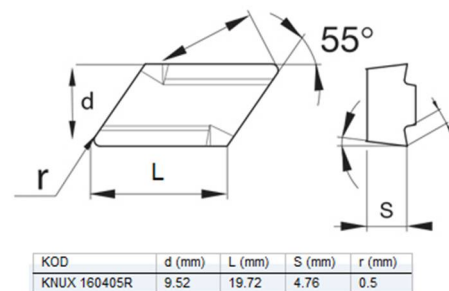


Figure 2. Geometric properties of cutting tool

SEM and EDX analysis of surfaces of cutting tools were realized before and after turning processes with Jeol JSM-65 type device in Bingol University Research Center. SEM images of unused cutting tool before turning process are given in Figure 3.

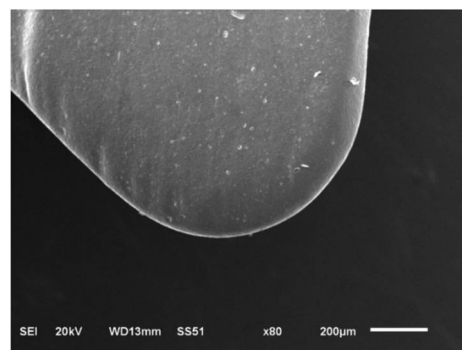


Figure 3. SEM images of unused cutting tool edge before turning process ($r=500$ µm)

Surface roughness values was measured by using INSIZE ISR-C100 model of profilometer after every turning process. Measurements were based on R_a method and the sampling length ($L_c=0.8$ mm), measuring length ($L_m=4$ mm) and traverse length ($L_t=5.6$ mm) are taken, respectively. Surface roughness was measured five times and its average value was calculated and used to plot graphics about surface roughness and cutting speed. Surface roughness shapes of cylindrical bars after finishing turning process can be seen in Figure 4.

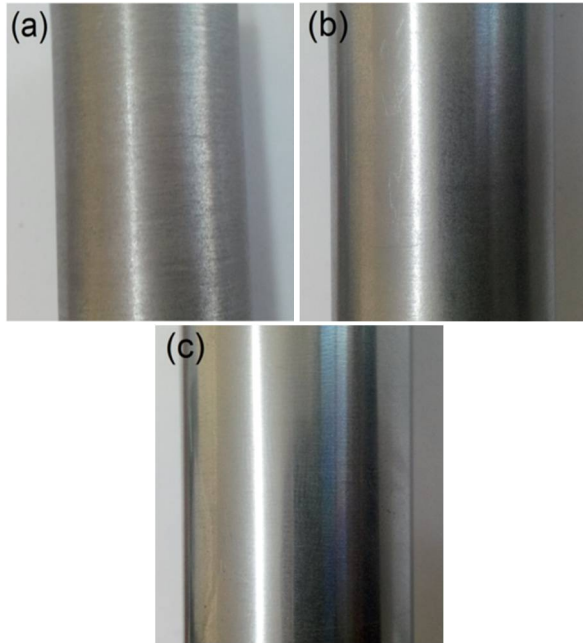


Figure 4. Images of cylindrical bar surfaces after the last turning process at cutting speeds: (a) 31 m/min, (b) 126 m/min, (c) 179 m/min

3. Results and discussions

3.1. SEM and EDX analysis of cutting tools

In first turning process for 31, 126 and 179 m/min cutting speeds for 500 mm turning length, SEM images of tool edge wear are given in Figure 5. Cutting tool is forced to take more chip because of choosing low cutting speed. Therefore, chipping is occurred on tool at cutting speed for $V_c=31$ m/min (Figure 5a). Chipping on tool decreases with increasing cutting speed and BUE (build up edge) formation starts to seem. Furthermore, coatings on tool were worn more in the heat effected zone. Because of that, decreasing in coating density can be seen from middle of tool to edge (Figure 5b, 5c).

Figure 6 shows that SEM images of tool edge wear for the same cutting speeds for 1000 mm turning length in second turning process. Increase on chipping is seen in second turning for the lowest cutting speed (31 m/min). This increase gives us information like that tool used for lowest cutting speed is forced more than other high ones (Figure 6a). Wear of coating can be seen clearly along cutting side in turning process for 126 m/min cutting speed (Figure 6b). The heat energy formation between contact points of cutting tool and workpiece is expected to reach the highest values because of that obtained max mechanical energy from turning AISI 1040 steel in highest cutting speed (179 m/min). In other words, tool edge is exposed to max heat effect. For this reason, max tool wear is seen in 179 m/min cutting speed (Figure 6c).

As a result of third turning process for each cutting speeds for total 1428 mm turning length, SEM images of tool nose wear are given in Figure 7. Cutting tool used in lowest cutting speed (31 m/min) was damaged by breaking the end of tool nose (Figure 7a). Burned chips had been occurred on tool nose because of that cutting tool was used in the highest cutting speed (179 m/min). In addition, BUE formation and local chip smearing are seen on cutting side of tool. Starting of coating wear on tool has been become clear (Figure 7c). In another studies, higher BUE formations and chippings could often be seen with increasing cutting speed in turning process [22-25].

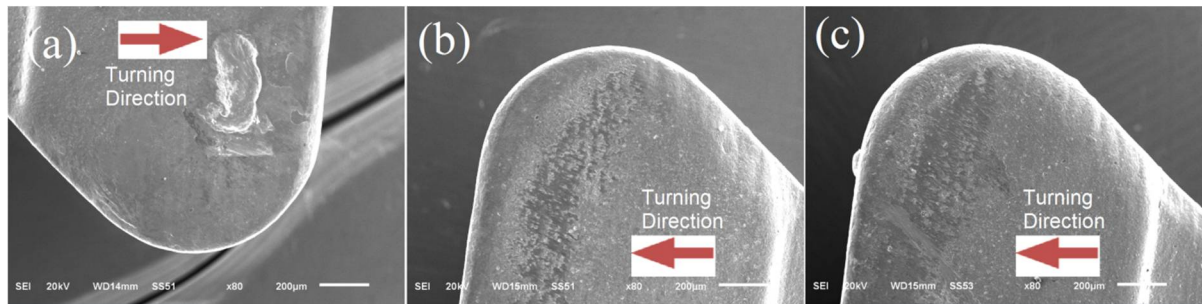


Figure 5. SEM images of cutting tools after first turning process ($L=500$ mm): (a) $V_c=31$ m/min, (b) $V_c=126$ m/min, (c) $V_c=179$

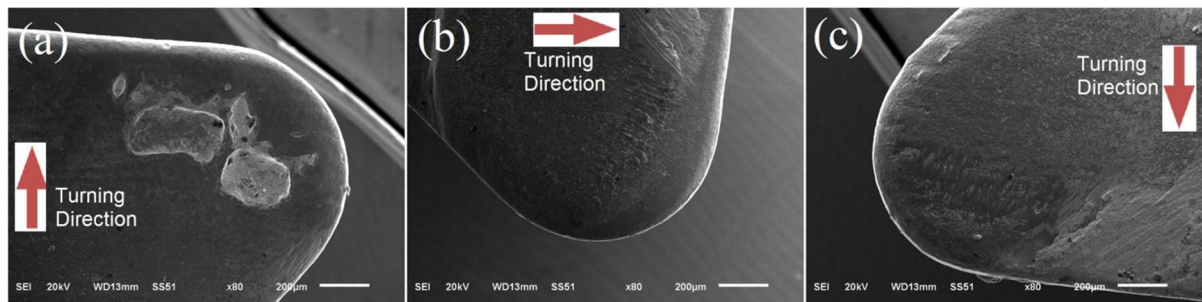


Figure 6. SEM images of cutting tools after second turning process ($L=1000$ mm): (a) $V_c=31$ m/min, (b) $V_c=126$ m/min, (c) $V_c=179$ m/min

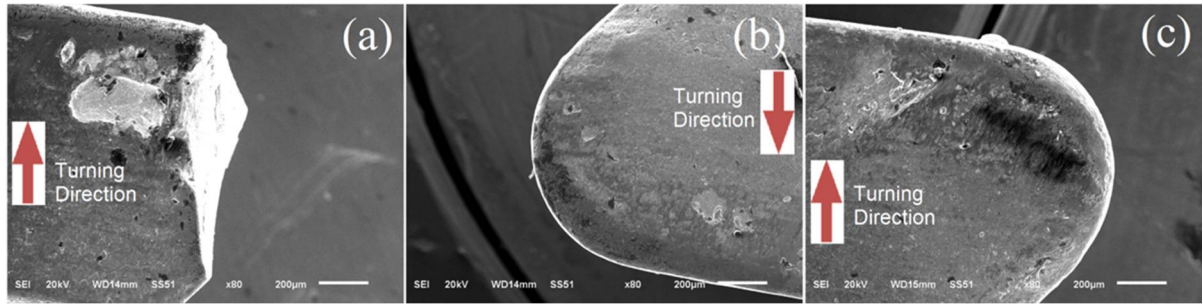


Figure 7. SEM images of cutting tools after third turning process (L=1428 mm): (a)Vc=31 m/min, (b)Vc=126 m/min, (c)Vc=179 m/min

SEM/EDX images of cutting tool used at 3 m/min cutting speed after third turning process (L=1428 mm) are given in Figure 8. According to the EDX analysis taken from broken zone of cutting tool, tungsten (W) elements were seen very much. A little iron (Fe) elements also were seen in this zone because cutting tool started to touch workpiece from broken zone and some Fe particles came from workpiece to broken zone of tool edge (Figure 8a).

By examining EDX analysis of adhesive part on tool, Fe elements were found so much in it. Moreover, finding out certain amount of aluminium (Al) particle in EDX analysis is thought that aluminium and chips mixed with effect of heat formation during turning process (Figure 8b).

According to elemental analysis from little worn zone of coating, titanium (Ti), aluminium and nitrogen (N) elements were encountered in coating zone. we can understand that coating is in a good situation far from tool edge (Figure 8c). Figure 9 shows that SEM/EDX analysis of used cutting tool in third turning process (L=1428 mm) at 126 m/min cutting speed. At examined elementary analysis from far zone of tool edge, coating of cutting tool was worn less at this zone because of that there were lots of titanium and aluminium

elements which constitute content of coating and it was seen in Figure 9a. Encountering Fe element in small quantities shows that they came from workpiece to tool surface during turning process (Figure 9a).

Tungsten, carbon (C) and cobalt (Co) elements were found out on zone of tool edge which cutting tool consists. This situation shows that coating was worn in some zones. There are also a lot of aluminium and titanium elements in zone so we think that coating is still good on edge zone (Figure 9b). By the examining of white spotted zones on tool surface, becoming so much of iron elements percentage, we think that these pieces came from workpiece during turning process (Figure 9c).

By the investigating SEM/EDX analysis images of tool edge used at 179 m/min cutting speed, there were a lot of aluminium elements in black zone near cutting tool edge which tool coating contained. It was thought that coating consists of heaps because of high temperature in this zone (Figure 10a). It was observed that coating was protected by investigating EDX analysis from middle of tool (Figure 10b). White coloured spots contains particle which came from workpiece like happening on other tools (Figure 10c).

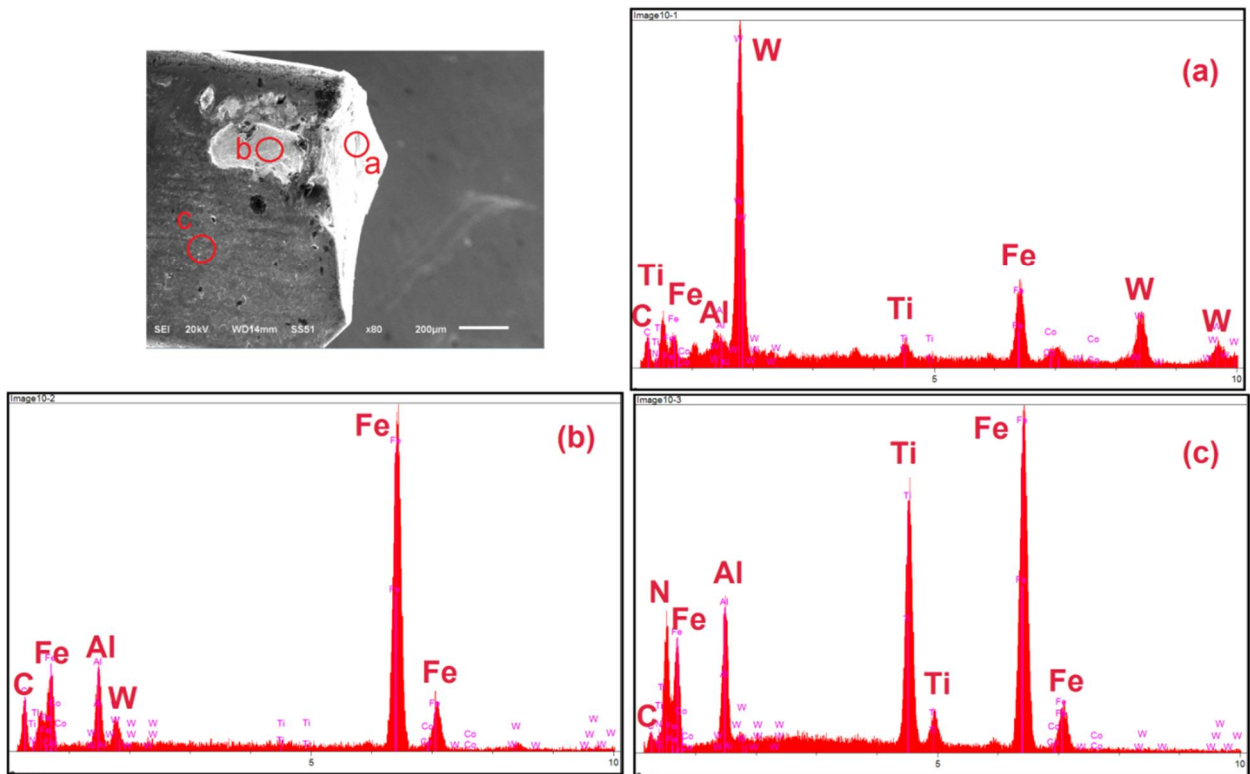


Figure 8. SEM/EDX images of cutting tool broken at 31 m/min cutting speed after third turning process (L=1428 mm)

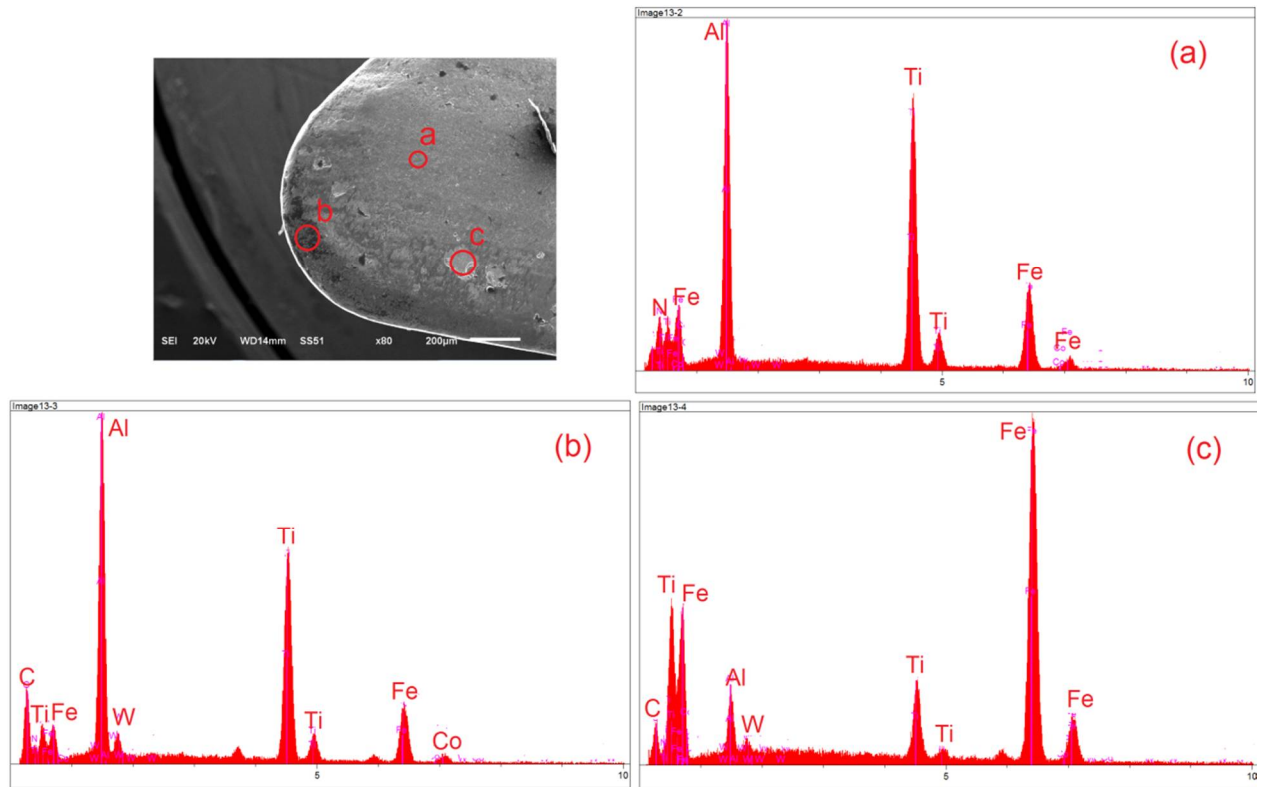


Figure 9. SEM/EDX images of cutting tool used at 126 m/min cutting speed after third turning process (L=1428 mm)

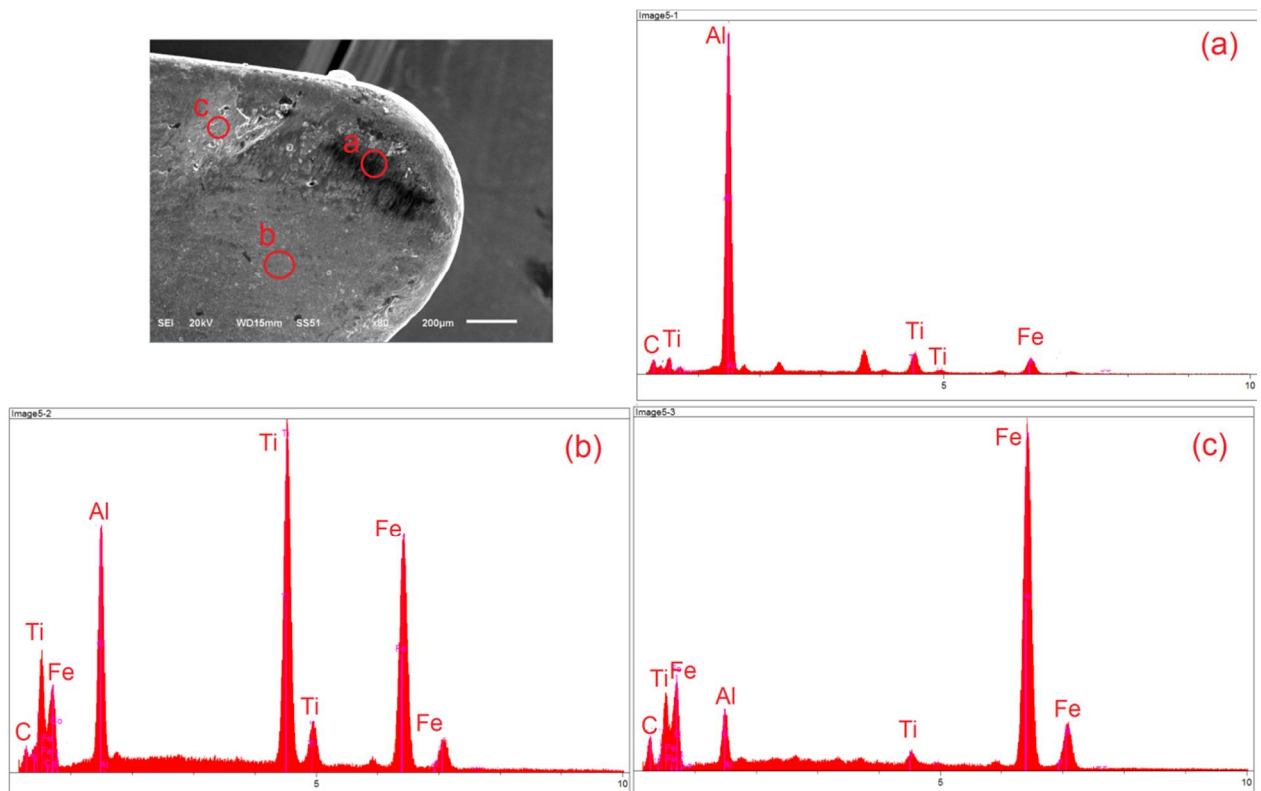


Figure 10. SEM/EDX images of cutting tool used at 179 m/min cutting speed after third turning process (L=1428 mm)

Figure 11 shows changes of radius values by depending on different cutting speed and turning length. Increase of cutting speed and turning length caused to always increase radius values of tool edge. Geometry of tool edge radius changed and radius value was too high because of damaging of cutting tool in third turning process at the lowest cutting

speed. For this reason, the radius value of broken tool was showed out of the graphic (Figure 11). Increasing usually of tool wear, which was directly proportionate to the increasing of cutting speed in turning process with different types of workpiece and cutting tool, was determined in also another studies [25, 26].

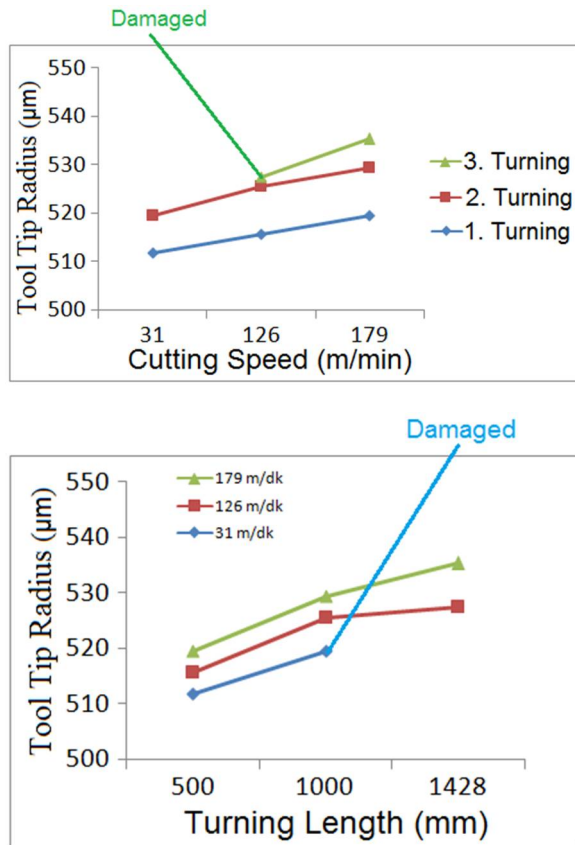


Figure 11. Changes of tool edge radius values depending on different cutting speed and turning length

3.2. Chip formation

Photos of chip shapes are given in Figure 12 after turning process at three different cutting speed. Increase at chip lengths depending on increase at cutting speed was also watched (Figure 12). Long chip can damage and change the surface quality of workpiece if it touches during turning process. For this reason, throwing chips in broken, short length and little pieces situations should be better during turning the bars with cutting tools. In next studies, increasing the feed rates will curtail length of chips.

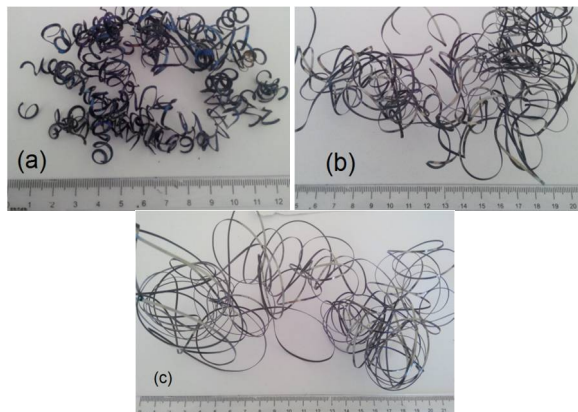


Figure 12. Obtained chip formations at different cutting speeds; V_c =(a) 31 m/min, (b) 126 m/min, (c) 179 m/min

3.3. Surface roughness

Figure 13 shows that change of surface roughness values depends on different cutting speed and turning length.

Reduction on surface quality was watched in turning process at lower cutting speed. Increase rate of surface roughness values at lowest cutting speed (31 m/min) is more than other increase rates at higher cutting speeds with the passing of turning process. The reason for this, cutting tool is forced more in turning at this cutting speed and couldn't reach intended energy to cut chips easily. Therefore, higher cutting speeds can be used to have better surface quality. Better surface quality was obtained in turning process at higher cutting speeds and it is given in Figure 13a. Furthermore, increase is usually seen at surface roughness values depending on turning length. This situation shows that cutting tools were abraded at each three cutting speeds. In addition to that, increase at surface roughness depending on turning length can be seen clearly at lowest cutting speed (31 m/min) because of having faster increase rate (Figure 13b). In another study about AISI 1040 steel, decreasing of surface roughness values were determined during increasing cutting speed [6]. If increasing of cutting speed goes on, surface roughness decreases until optimum point and starts to take bad situation [27].

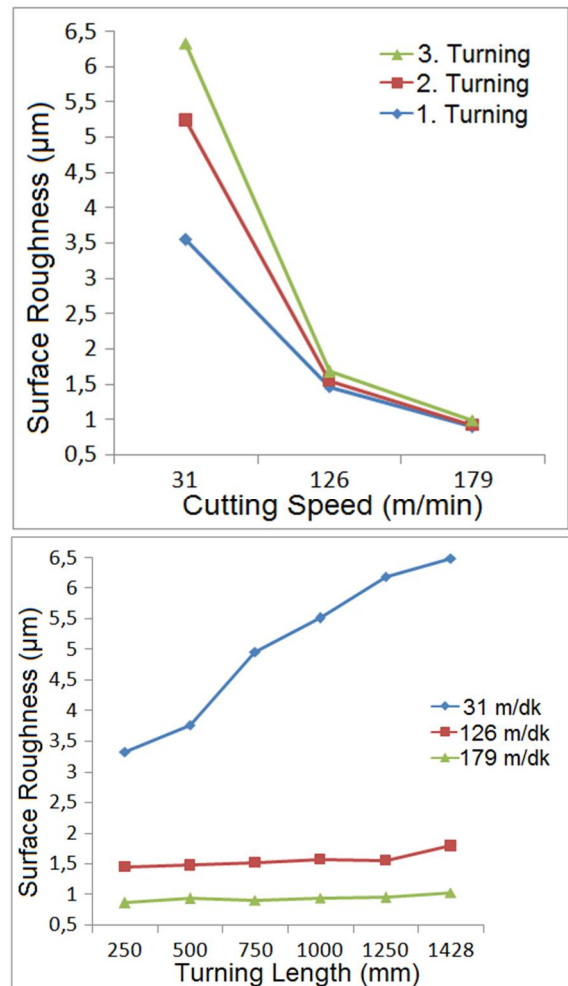


Figure 13. Changes of surface roughness values depending on different cutting speeds and turning length

4. Conclusions

Surface quality of workpiece and wear of coated cutting tool after turning at different cutting speeds were examined. We determined that cutting tool turned at lowest cutting speed was damaged because of choosing cutting speed very low. Increases at radius values of tool edges were seen in turning process at all cutting speeds until the time of broken

of tool turned at lowest cutting speed. Breakups had happened on surface of workpiece depending on turning length. In addition to this, max wear and BUE were shown up on cutting tool turned at highest cutting speed. More volume of BUE was seen by the increase of turning length.

The least tool wear was observed at lowest cutting speed. However, this cutting tool was damaged in a short time in contrast with other tools turned at higher cutting speeds. The reason for this, intended energy to cut chip from workpiece couldn't be reached at lowest cutting speed. Therefore, this tool was forced by bigger forces in contrast with tools used at higher cutting speed and was damaged.

The best surface roughness values were reached in turning process at highest cutting speed. Furthermore, by increasing turning length, decreasing at surface quality was observed in turning process at each three cutting speed. Surface quality depending on turning length was become deformed very fast at lowest cutting speed.

Longer chips have been in turning process at higher cutting speeds. Becoming very high of cutting speed in contrast with feed rate causes happening longer chips which is cut from workpiece. Feed rate can be increased to decrease length of chips.

Acknowledgements

The authors wish to thank Bingol University and Faculty of Engineering and Architecture for equipment support of machine tools and laboratory.

References

- [1] Lalbondre, R., Krishna, P. and Mohankumar, G.C. An experimental investigation on machinability studies of steels by face turning, *Procedia Materials Science*, 6, 1386-1395, 2014.
- [2] Qin, J., Long, Y., Zeng, J. and Wu, S. Continuous and varied depth of cut turning of gray cast iron by using uncoated and TiN/Al₂O₃ coated silicon nitride based ceramic tools, *Ceramics International*, 40, 12245-12251, 2014.
- [3] Whitney E.D. in: *Ceramic Cutting Tools*, Noyes Publications, New Jersey, 1994.
- [4] Uçun, İ., Aslantaş, K. and Apaydın, D. Finite element modelling of turning process using cutting tool with multilayer coatings, *Electronic Journal of Machine Technologies*, 7, 69-82, 2010.
- [5] Polak, T.A. and Pande, C. *Engineering measurement methods and intrinsic errors*, Professional Engineering Publishing, 139-140, UK, 1999.
- [6] Kavak, N. and Üstel, N. The investigation of surface roughness on AISI 1040 steel with dry turning, *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(2), 24-29, 2012.
- [7] Thomas T.R., *Rough Surface*, Longman, New York, 1982.
- [8] Shaw M.C., *Metal Cutting Principles*, Oxford University Press, London, 1984.
- [9] Trent E.M., *Metal Cutting*. Butterwoths, London, 1984.
- [10] Boothroyd G., *Fundamentals of Metal Machining and Machine Tools*, McGraw-Hill, International Student Edition, New York, 1981.
- [11] Gökkaya, H., Sur, G. and Dilipak, H. Experimental investigation of the effect of cemented carbide cutting tools coated by PVD and CVD on surface roughness according to machining parameters, *Technology*, 7(3), 473-478, 2004.
- [12] Yen, Y., Jain, C., et al. Computer simulation of orthogonal cutting using a tool with multiple coatings, *Machining Science and Technolog*, 8(2), 305-326, 2004.
- [13] Dobrzanski, L.A., Pakula, D., Kriz, A. Sokovic, M. and Kopac, J. Tribological properties of the PVD and CVD coatings deposited onto the nitride tool ceramics, *J. Mater. Process. Technol.*, 175, 179-185, 2006.
- [14] Hedenqvist, P., Olsson, M., Wallen, P., Kassman, A., Hogmark, S. and Jacobson, S. How TiN coatings improve the performance of high speed steel cutting tools, *Surf. Coat. Technol.*, 41, 243-256, 1990.
- [15] Gu, J., Barber, G., Tung, S. and Gu, R. Tool life and wear mechanism of uncoated and coated milling inserts, *Wear*, (225-229), 273-284, 1999.
- [16] Aslantaş, K., Uçun, İ. and Çiçek, A. Tool life and wear mechanism of coated and uncoated Al₂O₃/TiCN mixed ceramic tools in turning hardened alloy steel, *Wear*, (274-275), 442-451, 2012.
- [17] Moore D.F., *Principles and Application of Tribology*, Pergamon Press, Oxford, 1975.
- [18] Sayit, E., Aslantaş, K. and Çiçek, A. Tool wear mechanism in interrupted cutting conditions, *Mater. Manuf. Process*, 24, 476-483, 2009.
- [19] Zeyveli, M. ve Demir, H., Experimental investigating of surface roughness in machining hot work steel AISI H13, *Ege University Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences*, 25(1-2), 251-261, 2009.
- [20] Habalı, K., Gökkaya, H. ve Sert, H., Experimental investigating of the effects of cutting tool coating materials on surface roughness in machining of AISI 1040 steel, *Journal of Politek*, 9, 35-38, 2006.
- [21] Günay, M. Investigation of the interaction between the surface quality and rake angle in machining of AISI 1040 steel, *Sigma Müh. Fen Bil. Derg.*, 26(2), 105-111, 2008.
- [22] Pul, M. and Şeker, U. An investigation of wear behaviours of different cutting tools in machining by means of turning Al-MgO composites produced by vacuum infiltration method, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 28, 179-187, 2010.
- [23] Çiftçi, İ, Türker, M. and Şeker, U. Evaluation of tool wear when machining SiCp reinforced Al-2014 alloy matrix composites, *Materials and Design*, 25, 251-255, 2004.
- [24] Özçatalbaş, Y. Investigation of the machinability behaviour of Al₄C₃ reinforced Al based composite produced by mechanical alloying technique, *Composites Science and Technology*, 63, 53-61, 2003.
- [25] Kılıçkap, E., Çakır, O., Aksoy, M. and İnan, A. Study of tool wear and surface roughness in machining of homogenise SiC-p reinforced aluminium metal matrix composite, *Journal of Materials Processing Technology*, 164-165, 862-867, 2005.
- [26] Kannan, S. and Kishawy, H.A. Tribological aspects of machining aluminium metal matrix composites,

Journal of Material Processing Technology, 198, 399-406, 2008.

- [27] Çifçi, İ. Tool wear during machining of AISI 304 austenitic stainless steel using a coated cemented carbide tool, Technology, 7(3), 489-495, 2004.



Türk Doğa ve Fen Dergisi Turkish Journal of Nature and Science

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



Hidrofobik bitki ekstraktının kapsüle edilmesi için nanopartikül sisteminin hazırlanması ve fizikokimyasal, biyolojik özelliklerinin belirlenmesi

Bülent Kaya^{*1}, Uğur Taşkın²

Özet

Bu çalışma ile ilk kez *Alchemilla tiryalensis*, Eudragit polimerik adsorban (EE) ve Poli Vinil Alkol (PVA)'dan oluşan bir nanopartikül sentezi yapılmıştır. Halk arasında birçok hastalık için kullanılan *Alchemilla L.* cinsi etnobotanik olarak ‘Aslan Pençesi’ adı ile bilinmektedir. Bu partiküde *A. tiryalensis*'in yapraklarından elde edilen etil asetat ekstraktı kullanılmıştır. Ekstraktın serbest ve nanoküre (immobilize) halindeki biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri ile araştırılmıştır. Böylece farklı bir formda bitkisel ekstrakt ve ürün grubu oluşturulmuştur. Nanoküre boyutlarına inilmesi ile daha sonra anti kanser çalışmalarında kullanılabilen bir form ortaya çıkartılmıştır. Hücre kültüründeki çalışmalar için bir taşıyıcı hazırlama safhası gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda *AlcEN* nanokürelerin fiziko kimyasal karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), farklı özelliği olan tarama kalorimetrisi (DSC), Fourier transform kızıl ötesi spektroskopisi (FT- IR), ve çözünürlük çalışması ile belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışması sonucunda nanopartikül boyutları ortalama olarak 66,17 nm olarak belirlenirken zeta potansiyeli ise -24,6 mV olarak belirlenmiştir. Saf *A. tiryalensis* ekstraktının (serbest) ve *AlcEN* (immobilize) toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ve bunlara bağlı olarak da antioksidan etkileri araştırılmış, sonuçlar *AlcEN*'in etkinliğini ortaya koymuştur. İçlerinde bulunan toplam fenolik madde kısmının düşük olmasına rağmen yüksek süperoksit anyon giderimi ve antilipit peroksidasyon göstermiştir. Ekstraktın *AlcEN* formundan salınımı ise 1 saatlik sürede %82 seviyesine ulaşmış ve o seviyede sabit kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan; fenolik bileşikler; *Alchemilla L.*; *AlcEN*

Preparing nanoparticles for the capsule of hydrophobic plant extracts and determination of biological and physicochemical properties

Abstract

With this study a nanoparticles synthesis consisted of *Alchemilla tiryalensis*, Eudragit polymeric adsorbent (EE) and polyvinyl alcohol (PVA) was done for the first time. The *Alchemilla L.* ethnobotanical species that is known as 'Lion's Paw' among the people has been used for many diseases. In this particle, ethyl acetate extract was obtained from the *A. tiryalensis* leaf. The biological and physicochemical features of extract which are in free and nanoparticle (immobilized) form are presented. In this way, herbal extract and product group were created in a different form and necessary research and examination were done in this extract and product group. Thus, for future studies in cell culture, a preliminary-carrier preparation stage was formed. For this purpose, physicochemical characterization of *AlcEN* nanoparticle was determined by scanning electron microscope (SEM), scanning calorimetry which has various features (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and solubility practice. At the end of this characterization stage, the nanoparticles average sized was determined 66.17 nm and zeta potential was identified and characterized as -24.6 mV. *A. tiryalensis* extract (free) and *AlcEN* (immobilized), total phenolic and flavonoid content and antioxidant effects depending on those content were investigated. The effectiveness of *AlcEN* form was demonstrated by the results. Despite the low total phenolic substances contained in *AlcEN* form, it showed high superoxide anion removal and antilipid peroxidation. The release of the extract in the form of *AlcEN* has reached the level of 82% in 1 hour period and then remained stable at that level.

Keywords: Antioxidant; phenolic compounds; *Alchemilla L.*; *AlcEN*

1. Giriş

Alchemilla türleri Rosaceae familyasına aittirler. Rosaceae otsu ve odunsu bitkilerin bulunduğu

¹ Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

² Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

**Sorumlu yazar E-posta: bkaya@bingol.edu.tr

dikotiledonların büyük ve önemli familyasıdır. Bu familyanın 122 cinsine dahil 3370 kadar türü vardır. Yapraklar tam veya tüysüdü, stipul olarak yaprak sapının tabanına kadar birleşik, bazen düşüçüdür. Çiçekler erdişi, ender tek eşeyli, aktinomorf, epigin, perigin çoğunlukla hipantiyum mevcuttur. Kaliks ve korolla 5'er parçalı (ender olarak 3 veya çok sayıda) stamenler 5-∞ çoğunlukla 10 tane,

ovaryum tek veya 1-5 karpelli veya çok sayıda, meyva, nuks, drupa, folikül veya agregattır. Birçok türü süs bitkisi olarak park ve bahçelerde yetiştirilmektedir. Bazı türleri ise halk arasında "aslanpençesi" olarak bilinmekte yararları üzerine geniş yapıklarının kapatılması suretiyle tedavi edici özelliği olduğu bilinmektedir. *Alchemilla*'nın bazı türleri ise botanik bahçelerinde kültüre alınarak kullanılmış bazı türleri idrar söktürücü bazı türleri kan durdurucu ve çıbanların olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır. Bazı Türleri içinde antikansorejen çalışmalar yapılmış ve yapılan çalışmalarda apoptotik etkileri gözlemlenmiştir [1-3]

Ayrıca alternatif tıp olarak bilinen yöntemle de bitkiler değişik ekstrakt, karışım ve formülasyonda hazırlanarak çeşitli rahatsızlıklara karşı etkili bir şekilde kullanılabilmektedir. Bitkilerden antioksidan ve antibakteriyel madde eldesi ile antibiyotik kullanımının azalması beklenmektedir. Bilindiği gibi antibiyotiklerin yararlarının yanı sıra birçok yan etkilerinin var olduğu modern tıbbında kabul ettiği bir gerçektir. Öncelikle organizmada yer alan yararlı birçok mikroorganizmanın da ölmesine neden olmaktadır. Ayrıca bakteri suşlarının zamanla antibiyotiklere karşı direnç kazanması da antibiyotiklerin önemini yitirmesinin nedenlerindedir.

Bitkiler alemi içinde yapılan bu tür çalışmalarda en çok bitkilerin fenolik bileşiklerinin tedavi edici gücü üzerine dizayn edilen çalışmaları olarak son yıllarda literatürde sıkça rastlanan doğal bir durumdur. Bu özellikle bitkilerin içerdikleri fenolik asitler ve flavonoid bileşikleri açısından irdelenmektedir. Fenolik maddeler antioksidan açıdan yüksek miktarda etki göstermektedir.

Reaktif oksijen türü olarak adlandırılan süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi oksidatif maddelerin oluşumu oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Bu maddelerin oluşumu fizyolojik şartlarda ve dış etkenlerin etkisiyle olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek miktarlarda oluşumu klinik olarak bir çok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Bu hastalıklar genellikle; kalp hastalıkları [4], diyabet [5], karaciğer hasarı [6], kanser [7], yaşlanma [8] gibi oksidatif dejenerasyon sonrasında oluşmaktadır. Bu klinik hastalıkların süreçlerinin gelişmesinde birçok hasarın birleştirici bir mekanizması olduğu da bilinmektedir. ROS ve antioksidan dengesi, oksidatif stresten kaynaklanan hasar önlemede önemli bir mekanizmadır. Vitaminler [9], flavonoidler [10] gibi antioksidan içeren besin takviyeleri bundan dolayı birçok kronik hastalığın oluşmasını ve ilerlemesini önlemek için kullanılmışlardır.

Nanoparçacık sistemleri özellikle %85'e yakını su olan organizmada genellikle suda az çözünen ya da hiç çözünmeyen maddelerin taşınmasında kullanılmaktadır. Nano parçacıkların kullanımı çeşitli araştırmacılar tarafından denenmiştir. Bunlara örnek olarak ellagik asitin [11] ve e koenzim Q10'un [12] gibi suda çözülmez bileşikler için ilaç salgılamada özellikle faydalı olabilecekleri üzerine araştırmaları yaygınlaşmıştır, çünkü ebatları 1000 nm'den az olacak şekilde dizayn edilebilen nanopartiküller ilacın emiciliğini ve biyo elverişliliğini arttıracaklarından bahsi edilen boyutların altındaki nano boyutların sentezi üzerine yönelmişlerdir. Bu çalışmaların tamamı birçok saf madde ya da standart olarak organik sentez ile elde edilen maddelerdir.

Bundan dolayı yeni bir bitkisel ekstrakt parçacık sistemi (*AlcEN*) Eudragit® E (EE) ve polivinil alkol (PVA) taşıyıcı olarak nano çöktürme sistemi ile hazırlanmıştır. *AlcEN*'in fiziko kimyasal karakterizasyonu taramalı elektron mikroskopu (SEM), farklı özelliği olan tarama kalorimetrisi (DSC), toz röntgen difraksiyonu (XRD), Fouriertransform kızıl ötesi spektroskopisi (FT- IR), ve çözgünlük çalışması ile denetlenmiştir. Dahası, saf *Alchemilla L.*'nin etil asetat ekstraktı kullanılmıştır. Bu ekstrakt seçilmesinin amacı yüksek miktarda fenolik madde içermesi ve suda

çözünmemesidir. Bu ekstraktın ve nano parçacıklarının (*AlcEN*) toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ve antioksidan etkileri ile antibakteriyel etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla bu çalışmada daha önce çeşitli şekilde çalışmış olduğumuz *Alchemilla L.* Cinsi ailesine ait bitkisel ekstraktı elde edilmiş nanopartiküllerin antioksidan özellikleri incelenmiştir.

Çalışmanın amacı ise Türkiye'deki mevcut bulunan *Alchemilla L.* türlerinin bazılarının yapraklarındaki bileşiklerin ekstraktlarından nanoküreler hazırlanmasını ve nanoküre formundaki etkinliğinin araştırılmasını yani bir nevi immobilize edilen bileşiklerin etkinliği belirlemektir. Sonrasında bu fraksiyonlardaki bileşiklerden kaynaklanan antioksidan özellikleri belirlenerek doğal olarak gösterdiği antioksidan özellikleri ortaya çıkartılacaktır. Bu çalışmada, *Alchemilla* cinsinin ekstraktlarının immobilize edilerek uzun süre etkinliği korunmasının sağlanması amacıyla dolayı önemlilik arz etmektedir. Bu ekstraktların immobilize edildikten sonraki aktiviteleri nanoküre formu üzerinden değerlendirilecektir.

2. Materyal ve metot

2.1. Materyal

Kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler analitik ya da HPLC sınıfı saflıkta kullanılmıştır. PCL, PLGA, PLA, PHEMA Hidrofilik Polimer Span 80, Tween 80, NaCl, NaOH, Sikloheksan, Aseton, Asetik Asit, PVA, 1,2-Dimiristoyl-Rac-Glycerol-3-Phosphocholine, Poly Ethylene Glycol Diacrylate, 2-Hydroxy-2-Methyl propiophenone, 97%, Etil Asetat, Kloroform, Folin Ciocaltaeu reaktifi, Na₂CO₃, NaNO₂, AlCl₃.H₂O, NaOH Filters Pore Size: 0,2, Luperox A75 Benzoyl Peroxide, Polivinil Alkol (PVA), Tris- HCl, Tiyobarbiturik Asit (TBA), Ferrüsklorit, Askorbat, Ksantin, Ksantin Oksidaz, Sitokrom c, 2,2-Difenil -1- Pikrilhidrazil (DPPH), Dimetilsülfoksit (DMSO) ve Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA), Amino Alkil Metakrilat Kopolimerler (Eudragit® E; EE 100) alınmıştır. Bütün diğer kimyasal ayırıcılar analitik derecedendir.

2.2. Metot

2.2.1. Ekstraksiyon tekniği

Kuru bitki örneği havanda ezilerek toz haline getirilmiş ve etil asetat ile ekstraksiyon işlemine tutulmuştur. 24 saat boyunca çalkalamalı bir karıştırıcıda dakika da 200 rpm olacak şekilde karıştırılmıştır. Sonrasında ise bu ekstrakt sıvısı süzülmüş süzülen kısım basıncı azaltılmış rotaevaporatörde çözücüsü uçurularak içerisinde CaCl₂ konulmuş vakumlu bir desikatörde ekstraktın tamamen kurutulması sağlanmış, süzüntüde kalan bitki ikinci ve üçüncü kez ekstraksiyona alınmıştır [2].

2.3. Antioksidan çalışmalar

2.3.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine Gamezmeza ve Ark. kullandıkları yöntem kullanılarak yapılmıştır [13]. Standart olarak kullanılan gallik asit ve çalışılan bütün örnekler, %70'lik metanol içinde hazırlanmıştır. 0.5 ml örnek, 2.5 ml Folin Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpüne karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorbanları UV spektrofotometresi'nde 750 nm'de okunarak toplam fenol

miktarları; gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallikasite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

2.3.2. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Folin ve Ciocalteu'nun metodu kullanılarak toplam fenol içeriği gallik asit eşdeğeri olarak kilogram başına hesaplanmıştır. 1 ml örnek bitki ekstraktı 1 ml of Folin Ciocalteu fenol ayırıcı ile karıştırılmış 3 dakika beklenmiş dengeye getirilmiş olan 1 ml. Sodyum karbonat solüsyonu bu karışıma eklenerek son hacim 10 ml olana kadar distile su ile ayarlanmıştır. Daha sonra karanlık bir ortamda 90 dakika boyunca beklenerek süre dolmuş spektrofotometrede 725 nm'de absorbans değerler okunmuştur. Gallik asit standart ile hazırlanan standart kalibrasyon grafiğinde kilogram bitkide gallik asit eşdeğeri olarak miligram cinsinden hesaplanmıştır [14].

2.3.3. Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Toplam Flavonoid miktarının belirlenmesi için, bitki ekstraktı ve *AlcEN*'den 250 µl alınarak 1,25 ml distile suyun içerisine aktarılır bu karışımın üzerine 75 µl % 5'lik NaNO₂ solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. 5 dakika sonra % 10'luk AlCl₃.H₂O solüsyonu bu çözeltiye eklenerek karıştırılarak, takip eden altıncı dakikada, 1 M NaOH'dan 500 µl eklenerek üzerine 275 µl distile su eklenmiş tüm karışım çok iyi ve nazikce karıştırılmıştır. Ortaya çıkan pembe renk 510 nm'de okunarak daha önceden hazırlanan (+)-Catechin standart kalibrasyon grafiğinde göre okunarak (+) -Catechin eşleneği olarak toplam flavonoid içeriği bitkinin kilogramında miligram cinsinden hesaplanmıştır [14].

2.3.4. Toplam fenolik asit içeriği (TPA)

Taze olarak hazırlanmış bitki ekstraktı ve *AlcEN* (1.0 ml) 0.5 M hidroklorik asit (2.0 ml) ve 10 g sodyum nitrit 10 g sodyum molybdatenin 100 ml suda çözülmesiyle hazırlanan reagent (2.0 ml) eklenmiştir. Bunu takiben % 8,5 (w/w) sodyum hidroksitten (2.0 ml) eklenmiştir. Daha sonra son hacim 10 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Absorbans 505 nm de kör olarak her bir ekstrakt için 10 ml su kullanılarak okutulmuştur. Toplam fenolik asit içeriği sinapik asit kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon eğrisinden sinapik asit eş değeri (mg/g) olarak toplam fenolik asit içeriği hesaplanmıştır [15].

2.3.5. DPPH radikalinin etkisinin giderilmesi

Bitki ekstraktının ve *AlcEN* (0.3 ml) içerisinde litrede 6×10^{-5} mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikali içeren 2.7 ml metanolik solüsyon eklendi. Bu karışım güçlü bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlık bölgede bekletildi. DPPH radikalinin azalması 517 nm'de absorpsiyonun ölçülmesi ile belirlenmiştir. Bu radikalın etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapılmıştır [16]. Radikalın etkinliğinin giderilmesi için bitkiden elde edilen ekstarkt ile radikal karıştırılarak spektrofotometrik olarak okuma yapılmış ve bu okuma sonucunda DPPH'nin renginin giderilmesi ile etkinliğin miktarı hesaplanmıştır.

2.3.6. İndirgeyici güç özelliğinin ölçülmesi

Bitki ekstraktından ve *AlcEN*'den 2,5 ml alınarak 2,5 ml pH: 6,6 olan litresinde 200 mmol bulunacak şekilde hazırlanan sodyum fosfat tamponu ile %1'lik 2,5 ml potasyum fericyanit ile karıştırılmış ve 50 derece de 20

dakika inkübe edilmiştir. Üzerine %10'luk hazırlanan trikloro asetik asitten 2,5 ml katılmış ve bu karışım 1000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant alınacak yaklaşık 5 ml üzerine 5 ml deiyonize su ve 1 ml % 0,1'lik demir klorid konularak spektrofotometrik olarak 700 nm'de okuması yapılmıştır. Yüksek absorbans yüksek indirgeyici özelliği göstermiştir. BHA ve α -tokoferol standartlarına karşı hesaplama yapılarak sonuçlar verilmiştir [14].

2.3.7. Metal şelatlama aktivitesinin ölçülmesi

Metal şelatlama aktivitesine demir şelatlama özelliği üzerinden bakılmıştır. Dinis ve Ark. [17] metoduna göre yapılmıştır. Bu özellik belirlenmesi kısaca; 0,5 ml ekstrakt'a ve *AlcEN*'e 1,6 ml deiyonize su ve 0,05 ml 2 mM FeCl₂'den eklenerek başlanmıştır. 30 saniye sonrasında 5 mM Ferrozine'den 0,1 ml eklenecektir. Ferrozine iki değerlikli demir ile rekasyona girdiğinde suda çok iyi çözünür hale gelecektir. Bunu takiben 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen karışımın Fe⁺² Ferrozine kompleksinin absorbansı 562 nm.'de ölçülmüş ve aşağıdaki formül kullanılarak ekstraktın demiri şelatlama aktivitesi hesaplanmıştır.

Şelatlama Oranı=(A₀- A₁)/ A₀ x %100;
Burada A₀ kontrol ya da körün absorbansı, A₁ ise ekstraktın varlığında ölçülen absorbans.

2.3.8. Antilipit peroksidasyonunun belirlenmesi

Homojenleştirilmiş fare/sıçan karaciğerinde FeCl₂-askorbik asit endüklenmiş lipit peroksidasyon üzerinde bitki ekstraktı ve *AlcEN*'in anti lipit peroksidasyon etkisi Ohkawa ve Ark.'nın [18] yaptıkları çalışmaya göre gerçekleştirilmiştir. Homojene edilmiş % 20 karaciğer (w/v), bir politron homojenize ile 150 mM Tris- HCl tamponlu (pH 7.2) tarafından hazırlanmış, sonrasında ise 10 dakika boyunca 500 g'de santrifüj edilmiştir. Kısacası, 50 µl homojen 30 µl test örneğiyle, 10 µl 4 mM FeCl₂ ve 10 µl 0,2 mM askorbik asitle karıştırılmıştır. Karışım 1 saat boyunca bir eppendorf tüpünde 37 °C'de inkübe edilerek, sonra ise her bir tüpe 100 µl 0,1 N HCl, 40 µl % 9,8 SDS, 180 µl de iyonize su ve 400 µl % 0,6 TBA ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Tüpler 30 dakika boyunca 95 °C'de bekletilmiştir. Soğutulduktan sonra ise, tüplere 1000 µl n-butanol ilave edilmiş ve 25 dakika boyunca 100 X g'de santrifüj edilmiş, süpernatantlar akabinde bir spektrofotometreye 532 nm'de ölçülmüştür. Bütün tespitler üç defa tekrarlanacak. Lipit peroksidasyon inhibisyon yüzdesi bu denkleme göre hesaplanacak:

% inhibisyon = [(Ab532 indükte-Ab532 numune)/ (Ab532 endükte- Ab532 kontrol)]x100

Lipit peroksidasyonunun % 50 (EC50) de inhibisyon konsantrasyonu EC50 olarak gösterilmiş, anti lipit peroksidasyon aktivitesini kıyaslamak için kullanılmıştır.

2.3.9. Süperoksit anyonun temizleme etkisinin belirlenmesi

Süperoksit anyonun enzim formasyonu, sitokrom c metodu McCord ve Ark.'nın [19] kullandıkları redüksiyonuyla hesaplanmıştır. Önce, reaktif solüsyonu 50 mM KH₂PO₄, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM sitokrom c ve 0,1 mM ksantin eklenerek hazırlanmıştır. Devamında ise, 50 µl test örneği, 400 µl reaktif solüsyon, 530 µl saf su ve 20 µl ksantinoksidad küvete eklenerek, bütün numuneler 2 dakika boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. Sonrasında 550 nm'de spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Bütün tespitler 3 defa tekrarlanmıştır. Süperoksit radikalın

numuneye temizlenme yüzdesi bu denkleme göre hesaplanmıştır.

% Süperoksit Anyon Temizleme = [(Ab550 kontrol–Ab550 numune)/ Ab550 kontrol]×100

Her bir numunenin % 50 (SC50) de temizleme konsantrasyonu, süperoksit anyon temizleme aktivitesini kıyaslamak için kullanılmıştır.

2.4. *AlcEN* hazırlanması ve karakterizasyonu

2.4.1. Fiziki karışımlar

Fiziki karışımlar, bir eczacı havanı içinde *Alchemilla tiryalensis*: EE: PVA (1:1:1, 1:5:5 ve 1:10:10; w/w/w) farklı miktarlarla toz haline getirilmiş ve karıştırılarak farklı şekillerde hazırlanmıştır.

2.4.2 Nano parçacık sistemleri

Nano parçacık sistemleri nano çökeltme yöntemiyle *Alchemilla tiryalensis*: EE: PVA (1:1:1, 1:5:5 ve 1:10:10; w/w/w) farklı miktarlarla hazırlanmıştır [20-22]. 100 mg şeklinde bir miktar *AlcEN* ve uygun bir EE miktarı 50 ml. etanolde çözdürülmüş. Dahili organik aşama solüsyonları, uygun PVA miktarını içeren 150 harici sulu solüsyona hızlı bir şekilde enjekte edilerek, solüsyonlar 25 dakika boyunca 22,000 rpm'de homojenize edilmiştir. Etanol, dönerli vakum buharlaşma ile 40°C su banyosunda ortamdan uzaklaştırılmıştır.

2.4.3. Parçacık ebat analizi

AlcEN'in ortalama parçacık ebadı ve çok dağımlılık (polidispersite) endeksi (PI), bir N5 submikron (küçük partikül) parçacık ebat analizcisi ile tespit edilmiştir (Malvern boyut analiz sistemi ABD). Numuneler analiz için 10 kere saf su ile seyreltilmiş. Her değer üç tekrarla tespit edilmiştir. Sonuçları ise, ortalama ± standart distribüsyon olarak gösterilmiştir.

2.4.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

AlcEN'in morfolojisi bir taramalı elektron mikroskobuyla (JEOL JSM-6510) incelenmiştir. Bunu analiz etmeden önce numuneler %0,5 (w/v) fosfo tungstik asit ile koyulaştırılmış Au (altın) ile kaplanarak ızgaraya yerleştirilmiştir.

2.4.5 Değişken tarama kalorimetre (DSC)

Saf materyal ve liyofilize *AlcEN* termogramları, bir değişken tarama kalorimetresi kullanarak tespit edilmiştir. Her numunenin takribi 3 mg'ı 50- 350°C ısıda alüminyum tavalarda ısıtılmış ve tarama hızı 10°C dk⁻¹ de yürütülmüştür.

2.4.6. Fouriertransform kızıl ötesi (FT- IR) spektroskopisi

Numunelerin FT-IR spektrası bir Perkin-Elmer 2000 spektrometre (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, ABD) ile elde edilmiştir. Her bir numune ve potasyum bromit akik bir eczacı havanında karıştırılarak ve ince tabletlere kompres edilmiştir. Tarama kapsamı 370- 4000 cm⁻¹ olarak tespit edilmiş ve ayrışma 1cm⁻¹ şeklinde olmuştur. Her bir numune 3 kere ölçülerek kaydedilmiştir.

2.4.7. Sahnım çalışması

AlcEN çözünme çalışmaları, fiziki karışımları ve *AlcEN* 'in simule gastrik sıvıda (USP XXIV) gerçekleştirilmiştir. 100 rpm 'de bir çevirme paletiyle karıştırılacak olan 100 ml simule gastrik sıvı içine, 5 mg *AlcEN*'ne eşdeğer numuneler yerleştirilmiş, sonra, her bir numunenin 0,5 ml'si 5, 10, 20, 40, 60, 90 ve 120 dakikalık aralıklarla geri çekilmiş ve 40000 rpm santrifüjde çöktürülerek spektrofotometre de okunarak hesaplama yapılmıştır [22].

2.4.8. İstatiksel analiz

Bütün veriler ortalama ± standart sapmalar olarak ifade edilmiş ve tek yönlü analiz varyasyonu (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Scheffe'nin testi, SPSS bilişim ile istatistiksel anlamlılığı hesaplamak için P<0,05 ve 0,001 istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Antioksidan bulguları

3.1.1. Toplam fenolik madde miktarı

Yapılan hesaplamalar sonucunda bitki ekstraktı ve *AlcEN* sistemine giren fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Normal ekstraktın içerisinde *AlcEN* sistemine girenden yaklaşık 50 kat fenolik madde belirlenmiştir. Bu durum normal olarak ifade edilmiştir. Çünkü immobilize edilirken polimer yüzeyine bağlanmalar daha düşük miktarda kalmakta polimer içerisinde gömülü kalan ekstraktın etkinliğinde sınırlandırılmış olmaktadır. Bu çalışmaya ait sonuçlar tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Toplam fenolik madde miktarı

NUMUNE	MİKTAR (μg gallik asit/gr)
<i>A.tiryalensis</i>	10098,598±100,656
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	219,8286 ±17,258

3.1.2. Toplam flavonoid içeriği

Toplam flavonoid içeriğine ait sonuçlara bakıldığında farklı sıcaklık ve pH'larda çalışma yapılmadığından *AlcEN* fizikokimyasal özelliklerden bir kısmı belirlenememiştir. *AlcEN*'in şişme davranışı gösterip içerisindeki ekstraktı açığa çıkarma özelliği gözlenememiş olduğundan dolayı normal bitki ekstraktının *AlcEN* sisteminden yaklaşık olarak 400 kat daha yüksek miktarda flavonoid bileşiği içerdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar tablo haline getirilerek tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Toplam flavonoid miktarı

NUMUNE	MİKTAR (μg catechin /gr)
<i>A.tiryalensis</i>	18040,942±180,456
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	55,365±03,245

3.1.3. Toplam fenolik asit içeriği (TPA)

Bitki ekstraktı ve *AlcEN* sistemine ait sonuçlar fizikokimyasal çalışmalarda nanopartikülün davranışının tam olarak bilinmemesinden dolayı fizyolojik pH'da

yapılmıştır. Bundan dolayı *AlcEN* sistemi hazırlanırken elde edilen partiküllerin şişme ve büzülme özellikleri farklı pH'larda ve sıcaklıklarda incelenememiş olmasından dolayı mevcut pH'daki sonuçlar hesaplanarak tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Toplam fenolik asit içeriği

NUMUNE	MİKTAR (μg sinapikası /gr)
<i>A.tiryalensis</i>	13250,123 \pm 10,258
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	381,667 \pm 9,365

3.1.4. DPPH radikalının etkisinin giderilmesi

Serbest ve immobilize ekstraktalara ait radikal DPPH giderme aktiviteleri tablo 4'de verilmiştir. Immobilize ekstraktların DPPH aktivitesi serbest ekstraktın gösterdiği aktiviteden daha düşük aktivite göstermiştir. Sonuçlar tablo 4'de verilmiştir. Bu sonuçlar antioksidan açıdan saf maddeler ile elde edilen benzer çalışmadaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Wu ve Ark.'nın [22] EC_{50} değeri üzerinden nanopartikül sistemi saf quercetin'den daha düşük olarak bulunmuş aynı sonuç bizim çalışmamızda da ortaya çıkmıştır. O çalışmada EC_{50} değerleri quercetin nanopartikül sistemi, quercetin- DMSO değerleri sırasıyla 77.17 \pm 9.98 ve 62.72 \pm 7.68g/ml, olarak belirlenmiştir. Ancak quercetin-su formasyonunu 4575.72 \pm 525.46 g/ml olarak ölçülmüş ve quercetin nanopartikül sisteminin yaklaşık olarak 60 katı kadar yüksek çıkmıştır. Bu çalışmada ise Saf bitki ekstraktı 89,57 \pm 8,89 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nanopartikül halinde ise 274,56 \pm 25,825 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuç daha yüksek bir giderme aktivitesi göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen yüzde inhibisyon ve EC_{50} tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. DPPH'in yüzde giderimi

NUMUNE	YÜZDE GİDERME (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>A.tiryalensis</i>	% 90,79 \pm 5,21	89,57 \pm 8,89
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	% 29,38 \pm 2,11	274,56 \pm 258,25

3.1.5. Hidroksi radikal giderme özelliğinin ölçülmesi

Serbest ve immobilize ekstraktın bir diğer antioksidan özelliğinin belirlenmesi için yapılan hidroksil radikalı giderme özelliği ile ilgili sonuçlar tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Hidroksil radikalını giderme etkisi

NUMUNE	YÜZDE GİDERME
<i>A.tiryalensis</i>	% 97,79 \pm 9,89
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	% 85,77 \pm 7,48

3.1.6. Metal şelatlama (bağlama) aktivitesinin ölçülmesi

Demir bağlama aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında *AlcEN*' e bitjki ekstraktınınkinden çok daha az miktardaki sekonder metabolit bağlanmasına rağmen bitki ekstraktına yakın

metal şelatlama aktivitesine yaklaşılmıştır. Sonuçlar tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Metal şelatlama aktivitesi

NUMUNE	% İNHİBİSYON
<i>A.tiryalensis</i>	% 79,26 \pm 7,87
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	% 70,77 \pm 5,48

3.1.7. Antilipit peroksidasyonunun belirlenmesi

Antilipit peroksidasyon çalışmasında elde edilen sonuçlardan elde edilen veriler nanopartikül sistemine geçen yapının normal ekstraktın gösterdiğinden daha yüksek bir antilipit peroksidasyonu göstermektedir (Tablo 7). Önceki çalışmalarda göstermiştir ki [23,24] idebenone [23] ve melatonin [24] ile yapılan çalışmalarda nanopartikül formunun antioksidan ve invitro antilipit özelliği normal duruma göre artış göstermiştir. Başka bir çalışma da bir flavonoid olan Quercetin ile yapılmış ve aynı sonuca ulaşılmıştır [22]. Bu çalışmada antioksidan kapasiteye bakıldığında adı geçen çalışmalarda antioksidan kapasiteyle ilgili aynı sonuçlara ulaşılamamıştır. Ancak anti lipit peroksidasyon ile ilgili sonuç diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Tablo 7. Antilipit peroksidasyonunun % inhibisyonu

NUMUNE	% İNHİBİSYON
<i>A.tiryalensis</i>	% 1,628 \pm 0,09
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	% 14,956 \pm 1,08

3.1.8. Süper oksit anyon temizleme aktivitesi tahlili

Süperoksit anyon giderme etkisine bakıldığında ise yine aynı şekilde partikül sisteminin etkisi normal ekstraktından daha yüksek inhibisyon göstermektedir (Tablo 8). Bu sonuçlar antioksidan kapasitenin invitro açıdan belirlenmesi açısından değerlendirildiğinde Palumbo ve Ark. 'nın [23] ve Schaffazick ve Ark. 'nın [24] yaptıkları çalışmadaki sonuçlar ile örtüşmektedir.

Tablo 8. Süperoksit anyonunu temizleme aktivitesi

NUMUNE	% İNHİBİSYON
<i>A.tiryalensis</i>	% 1,578 \pm 0,14
<i>A.tiryalensis</i> -NANOPARTİKÜL	% 11,273 \pm 1,37

3.2. *AlcEN* hazırlanması ve karakterizasyonu

3.2.1. Fiziki karışımlar

Fizikî karışımlar, bir eczacı havanı içinde *AlcEN*: EE: PVA (1:1:1, 1:5:5) olarak etkin formasyon bulunmuştur. Bu miktarlar toz haline getirilerek ve karıştırılarak farklı şekillerde hazırlanmıştır.

3.2.2. Nano parçacık sistemleri

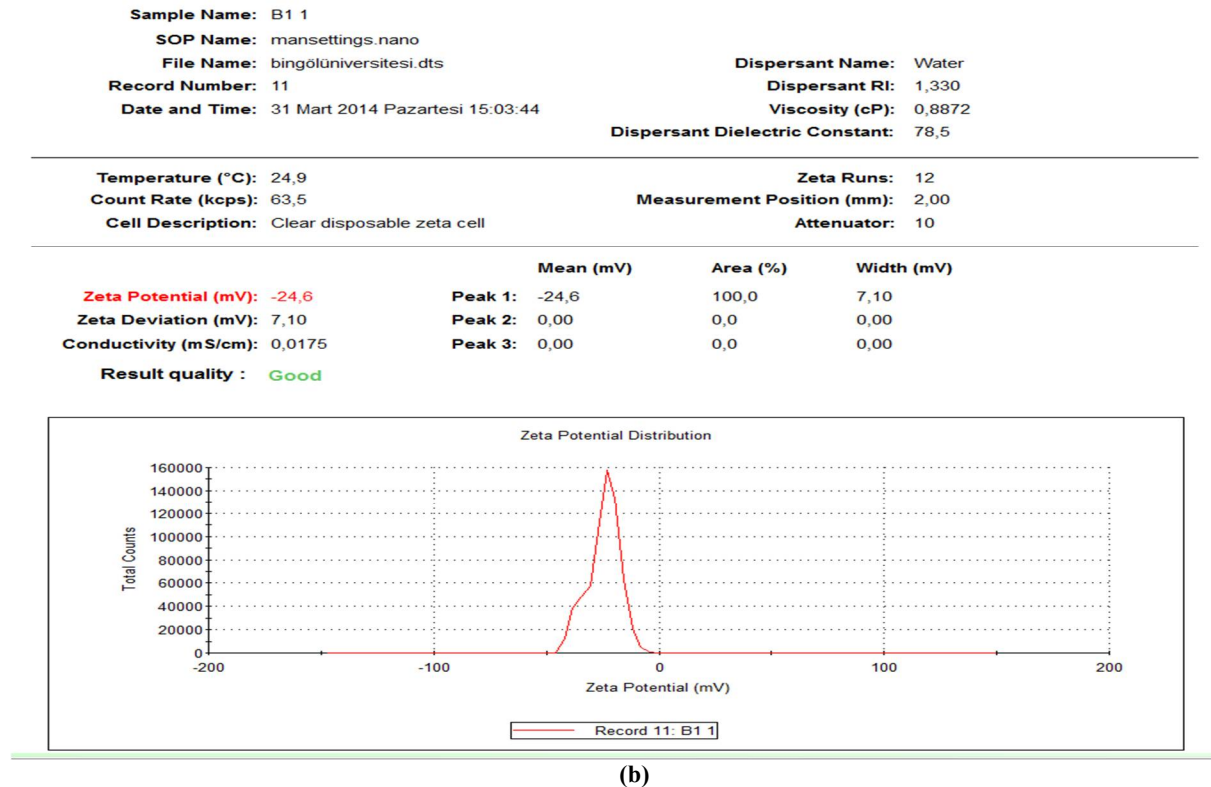
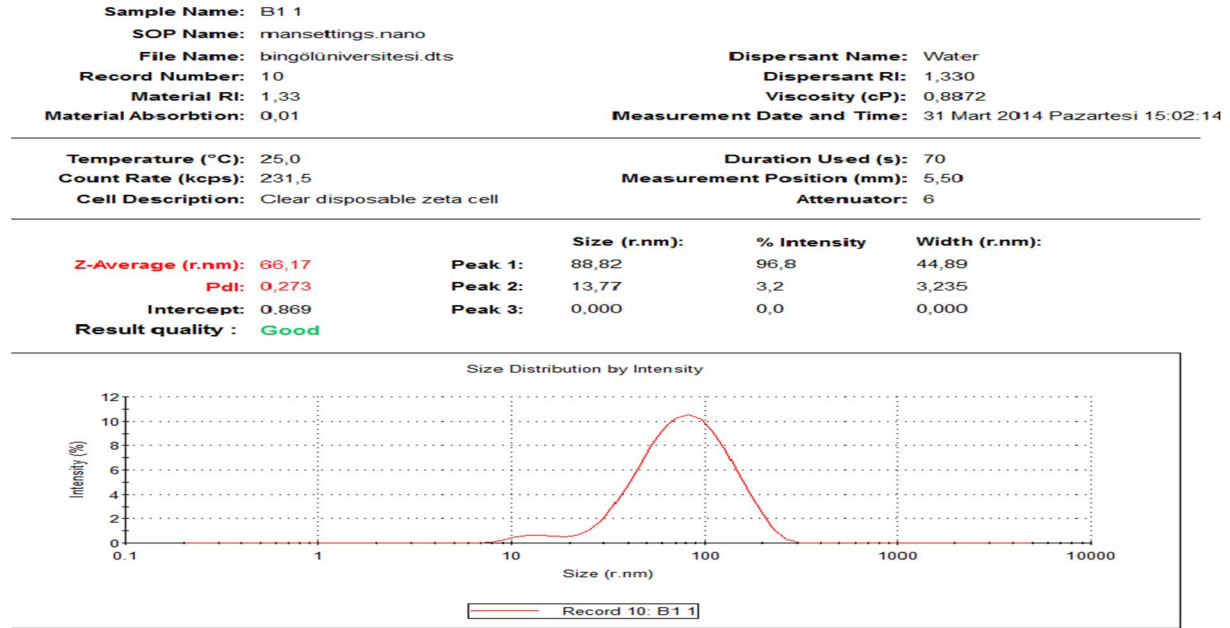
AlcEN sistemleri nano çökeltme yöntemiyle hazırlanmıştır. Bunun için *AlcEN*: EE: PVA (1:1:1) miktarlarla hazırlanmıştır. Kullanılan nanopartikül sistemi

için 25 mg şeklinde bir miktar bitki ve uygun bir 25 mg EE miktarı 25 ml. etanolda çözdürüldü. Dahili organik aşama solüsyonları, uygun Span 80 miktarını içeren 75 harici sulu solüsyona hızlı bir şekilde enjekte edilerek, solüsyonlar 25 dakika boyunca 22,000 rpm'de homojenize edilmiştir. Aseton, dönerli vakum buharlaşma ile 40 °C su banyosunda ortamdan uzaklaştırılmıştır.

3.2.3. Parçacık ebat analizi

AlcEN'in ortalama parçacık ebadı ve çok dağımlılık (polidispersite) endeksi (PI), bir N5 submikron (küçük partikül) parçacık ebat analizcisi ile tespit edilmiştir

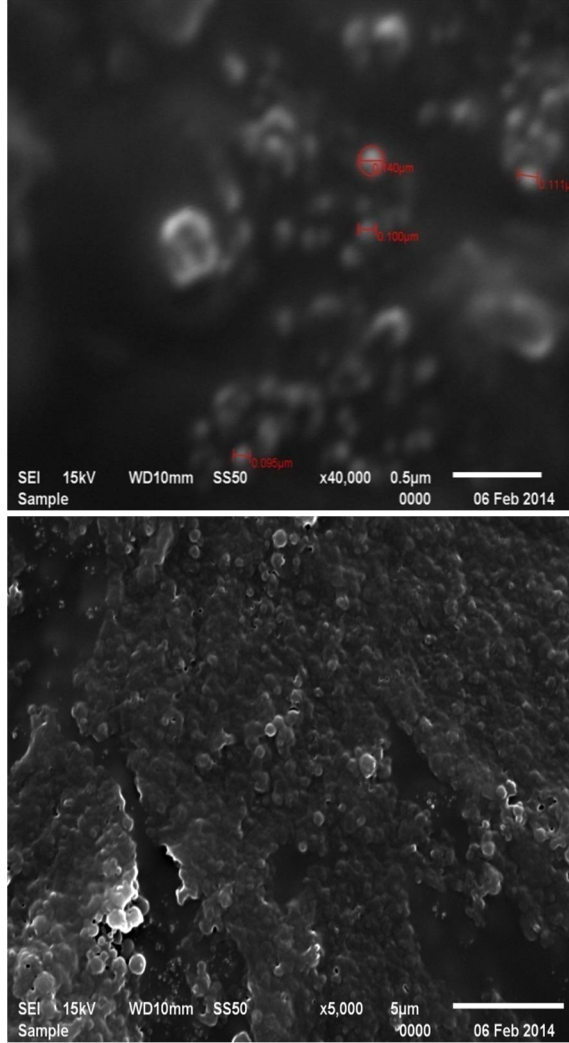
(malvern boyut analiz sistemi ABD). Numuneler analiz için 10 kere saf su ile seyreltilmiştir. Her değer üç tekrarlar tespit edilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere parçacık boyutu ortalama $66,17 \pm 2,58$ olarak tespit edilmiştir. Bu karışım sistemi kullanılarak Wu ve Ark.'nın [22] $479,9 \pm 107,73$ nm boyutunda quercetin nanopartiküller elde etmişlerdir. O çalışmada en küçük boyuta $81,9 \pm 0,26$ kadar düşülebilmektedir. *AlcEN* sistemi ile daha küçük partiküller elde edilmiştir. Yapılan bu analiz sonucuna göre ise ortalama nanopartiküllerin Zeta potansiyeline bakıldığında $-24,6$ mV olarak tespit edilmiştir. Sonuçları ise, ortalama \pm standart distribüsyon olarak gösterilmiştir.



Şekil 1. Nanopartikül Sisteminin; a) ortalama boyut analizi, b) zeta potansiyeli

3.2.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

AlcEN'in morfolojisi bir scanning elektron mikroskobuyla (SEM) incelenmiştir. Bunu analiz etmeden önce numuneler %0,5 (w/v) fosfo tungstik asit ile koyulaştırılmış ve gözlemlenmek üzere bakır ızgaraya yerleştirilmiştir. Üzeri altın ile kaplanarak iletken hale getirilerek yüzey analizi yapılmıştır. Buradaki boyutlar ve agregasyonlar gözlenmektedir. Bu boyutlar zeta boyut analiz sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

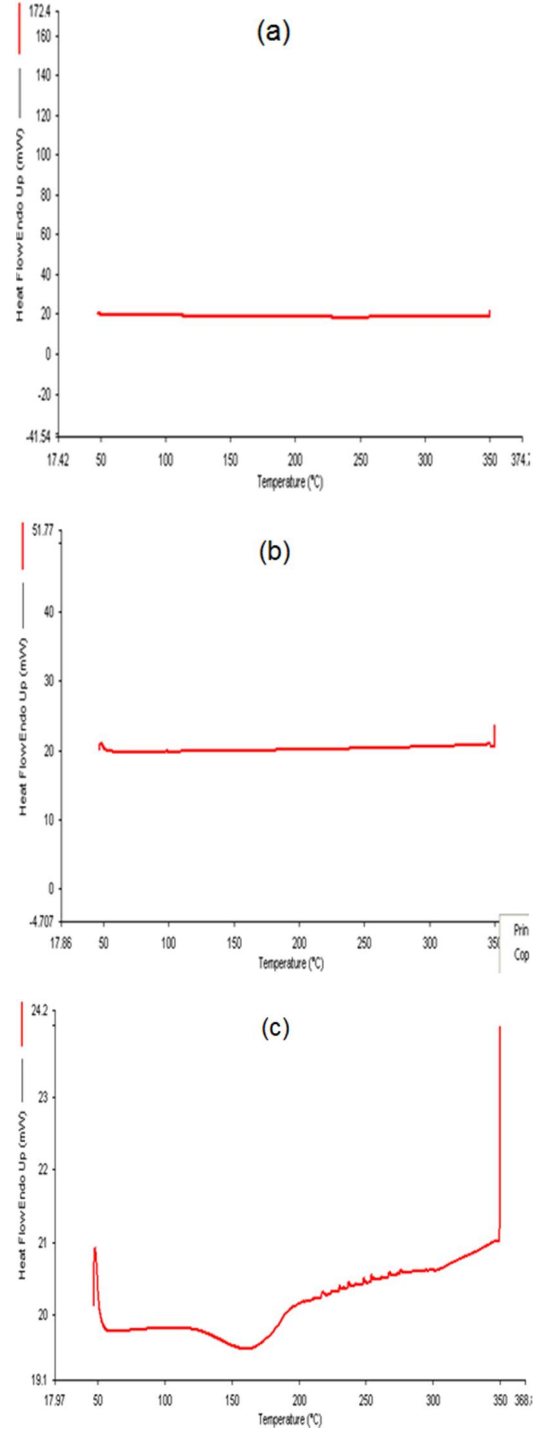


Şekil 2. SEM sonuçlarını gösterir fotoğraflar

3.2.5. Değişken tarama kalorimetresi (DSC)

Saf materyal ve liyofilize *AlcEN* termogramları, değişken tarama kalorimetresi (Perkin Elmer STA 6000) kullanarak analiz edilmiştir. Her numunenin takribi 3 mg'ı 50- 350°C ısıda alüminyum tavalarda ısıtılmış ve tarama hızı 10°C dk⁻¹ de yürütülmüştür. Şekilden görüldüğü üzere nanopartikül sisteminin termodinamik olarak erime noktası polimerde ve nanopartikülde bir değişiklik göstermemiştir. Nanopartikül formasyonunda içerisine hapsedilen bitki ekstraktı ile 200 ile 300°C bandında hafif oynamalar olmakla beraber termodinamik olarak erime noktası değişmemiştir. Partikül sisteminde 125 -160°C arasında bir ekzotermik geniş pik oluşmuş ama endorjonik olarak erime noktası 350 ° C'den sonra gözlemlenmiştir. Polimer 'in davranışı Jung ve Ark.'nın [25] yaptıkları çalışmayla örtüşmektedir. Normal şartlarda bitkinin endorjonik pikinin nanopartikül formasyonunda kaybolduğu gözlenmekte ve

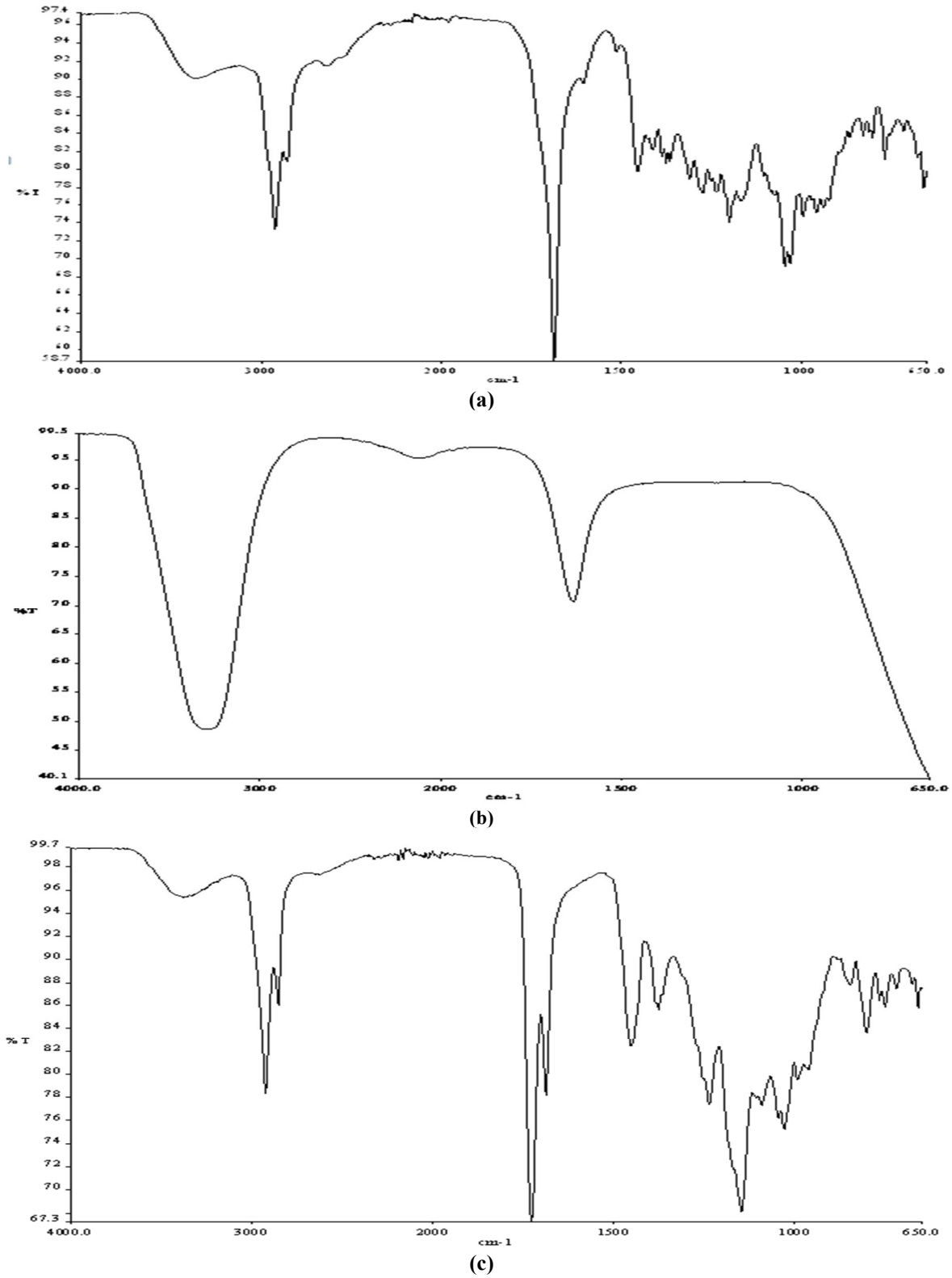
polimerin nanopartikül formasyonunda amorf bir dağılışa dağılarak yanma pikini absorbe edildiği görülmüştür. Bu sonuçlar Wu ve Ark. [22] tarafından yapılan çalışmayla benzerlik göstermektedir.



Şekil 3. DSC sonuçlarını gösterir diyagramlar, A. Bitki ekstraktı, B. Eudragit® E 100, C. Nanopartikül

3.2.6. Fouriertransform kızıl ötesi (FT- IR) spektroskopisi

Numunelerin FT-IR spektrisi bir Perkin-Elmer 2000 spektrometre (-Perkin-Elmer, Norwalk, CT, ABD) ile elde edilmiştir. Her bir numune ve potasyum bromit akik bir ezacı havanında karıştırılarak ve ince tabletlere kompres edilmiştir. Tarama kapsamı 370- 4000 cm⁻¹ olarak tespit edilmiş ve ayrışma 1cm⁻¹ şeklinde olmuştur. Her bir



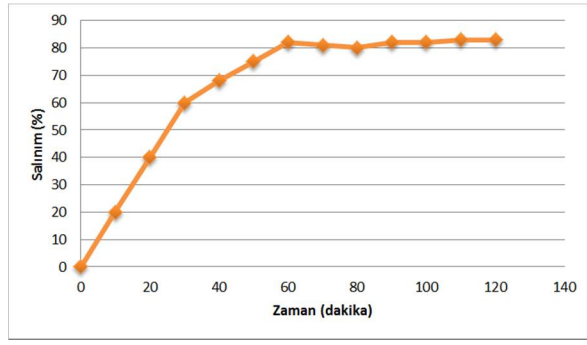
Şekil 4. FT-IR sonuçlarını gösterir diyagramlar; a) *Alchemilla tiryalensis* ekstrakt, b) Eudragit® E 100, c) AlcEN

numune 3 kere ölçülerek kaydedilmiştir. Yapılan ölçümlerden sonra bitki ekstraktındaki pikleri nanopartikül sisteminde gözlemlenmiştir. Burada 3400 nm civarında O-H piki gözlenmektedir. 1600 nm civarında C=O karbonil grubunda görülmektedir. Bu her iki pik genellikle fenolik maddeler için ayırt edici pikler olarak bilinmektedir [26,27]. Verilen şekillerden görüldüğü üzere yapılan çalışma sonrasında nanopartikül sistemi saf polimer ve saf bitki ekstraktının ortak piklerini içerdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan bitki ekstraktının polimer

ile birleştiği ve nanopartikül sistemini oluşturduğu gözlemlenmektedir.

3.2.7. Salınım çalışması

AlcEN salınım çalışmaları Wu ve Ark.'nın [22] çalışmalarındaki metot ile yapılmış ve salınım çalışmalarında %82 geri kazanım oranı ilk 60. dakikada elde edilmiştir. Zamana bağlı salınım değerleri Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. Zamana bağlı salınım değerleri

4. Sonuçlar

Bu çalışma ile hazırlanan *AlcEN* sistemi literatürde daha önceden saf ve standart maddeler ile hazırlanmış olan nanopartikül sistemi ile belirlenen yöntemlerin modifikasyonu ile bitkisel ekstrakta uygun olarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. *AlcEN*'nin ortalama boyutları 67,16 nm olan nanopartiküller elde edilmiştir. Bu nanopartiküllerden etkin maddenin geri kazanım ya da salınımı için en etkin süre 60 dakika olarak belirlenmiş bu sürenin sonucunda % 82 'lik bir salınım oranı devam eden dakikalarda sabit kalmıştır. *AlcEN* antilipit ve süperoksit anyon giderimi ve bazı antioksidan deneylerinde ise saf ekstraktın etkinliğinden daha yüksek aktivitede olduğu gözlemlenmiştir. Sentezlenen *AlcEN* sistemi geliştirilerek antikanser çalışmalarında kullanılabilir hale getirilmesi bu çalışmanın devamındaki hedefimizdir. Yani mevcut sentezlenmiş olan partikül boyutlarının ve ebatlarının içerisine etkin maddelerin enkapsüle edilmesi ve kanser hücrelerinde uygulanması düşünülmektedir. Böylece yapılacak olan bu çalışma ile etkin maddenin hedeflenen hücrelere taşınması ve bu bölgede salınımının belirlenmesi ile ilacın organizmada hedeflenerek etkinliğinin artırılması düşünülmektedir. Bu haliyle *AlcEN* klinik kullanımda yara tedavisinde, deri üzerinde uygulanabilirliği söz konusu olabilir.

Kaynaklar

- [1] Turk M, Kaya B, Menemen Y et al. Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells in vitro. *J Med Plants Res* 2011; 5, 4566-4571.
- [2] Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* L. species collected in the North-eastern Black sea region of Turkey. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2012, 2,9(3),418-25
- [3] Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. Flavonoids in the Endemic Species of *Alchemilla* L., (Section *Alchemilla* L. Subsection *Calycanthum* Rothm. Ser. *Elatae* Rothm.) from North-East Black Sea Region in Turkey. *Pak J Bot* 2012,44, 595-597.
- [4] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 2005, 115, 500-508.
- [5] Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharm* 2006, 212, 167-178.
- [6] Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroen Hepatol* 2011, 26, 173-179.

- [7] Klaunig JE, Kamendulis LM, GM W et al. the role of oxidative stress in carcinogenesis carcinogen risk assessment. *Annu Rev Pharmacol* 2004, 44, 239-267.
- [8] Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 2004, 125, 811-826.
- [9] Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults: Scientific review. *JAMA* 2002, 287,3116-3126.
- [10] Peluso MR. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006, 231, 1287-1299.
- [11] Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S et al. Sustained release nanoparticulate formulation containing antioxidant-ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration. *J Drug Target* 2006, 14, 27-34.
- [12] Hsu CH CZ, Mumper RJ, Jay M. Preparation and characterization of novel Coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS Pharm Sci Tech* 2003, 4, article 32.
- [13] Gamez-Meza N, Noriega-Rodriguez JA, Medina-Juarez LA et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. *J Am Oil Chem Soc* 1999, 76,1445-1447.
- [14] Barros L, Ferreira M-J, Queirós B et al. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem* 2007, 103, 413-419.
- [15] European Pharmacopoeia. In: of C, Europe eds. *Strasbourg* 2009,2377-2378
- [16] Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T et al. 2 New Flavonoids and Other Constituents in Licorice Root - Their Relative Astringency and Radical Scavenging Effects. *Chem Pharm Bull* 1988, 36, 2090-2097.
- [17] Dinis TCP, Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M., . Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radicals scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994, 315, 161-169.
- [18] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979, 95, 351-358.
- [19] McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969, 244, 6049-6055.
- [20] Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm* 2005, 294, 261-267.
- [21] Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 2005, 24, 67-75.
- [22] Wu T-H, Yen F-L, Lin L-T et al. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int J Pharm* 2008, 346, 160-168.

- [23] Palumbo M1 RA, Cardile V, Renis M, Paolino D, Puglisi G, Fresta M. Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. *Pharm Res* 2002,19,71-78.
- [24] Schaffazick SR, Pohlmann AR, de Cordova CAS et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int J Pharm* 2005,289, 209-213.
- [25] Jung J-Y, Yoo SD, Lee S-H et al. Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique. *Int J Pharm* 1999,187,209-218.
- [26] Gogoi N, Babu PJ, Mahanta C et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using alcoholic flower extract of *Nyctanthes arbortristis* and in vitro investigation of their antibacterial and cytotoxic activities. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015, 46, 463-469.
- [27] Yang N, Li W-H. Mango peel extract mediated novel route for synthesis of silver nanoparticles and antibacterial application of silver nanoparticles loaded onto non-woven fabrics. *Ind Crop Prod* 2013, 48, 81-88.



Türk Doğa ve Fen Dergisi
Turkish Journal of Nature and Science

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



Bazı Domates (*Lycopersicon esculentum* L.) çeşitlerinde, farklı NaCl konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi ve ortalama çimlenme süresi üzerine etkileri

Mehmet Yaman^{*1}, Ertan Yıldırım², Seda Belen², Cüneyt Bostancı²

Özet

Bu çalışma, farklı tuz konsantrasyonlarının bazı domates çeşitlerinde çimlenme döneminde etkilerini belirlemek amacıyla laboratuvar koşullarında yürütülmüştür. Çalışma materyalleri olarak 5'i hibrit, 5'i standart çeşit olmak üzere 10 farklı domates çeşidi kullanılmıştır. Çalışma tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 25 tohum olacak şekilde yürütülmüştür. Araştırma da domates çeşitlerine 5 farklı (0, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM) tuz konsantrasyonu uygulanmış olup domates çeşitlerinin çimlenme oranı ve çimlenme süresi araştırılmıştır. Deneme sonucunda farklı tuz konsantrasyonlarının domates tohumlarında çimlenme üzerine önemli derecede etki yaptığı bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre çimlenme oranı %0- %100, çimlenme süresi 1,9-10,58 gün arasında değişiklik göstermiştir. Ayrıca, 100 mM NaCl uygulamasının çimlenme oranına, 50 mM NaCl uygulamasının ise çimlenme süresine olumsuz etki yaptığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaya göre çeşit ortalamaları alındığında tuza en toleranslı çeşit 3 olarak bulunmuştur. Bunu çeşit 7 ve çeşit 9 izlemiştir. Tuza en hassas çeşit 5 olarak bulunmuş ve bunu çeşit 4, çeşit 6 ve çeşit 10 takip etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tuz stresi; domates; NaCl; çimlenme süresi; çimlenme oranı

Effects on mean germination time and seed germination of different concentrations of NaCl in some tomato (*Solanum esculentum* L.) varieties

Abstract

This study was carried out in laboratory conditions to determine the effects of different salt concentrations on some varieties of tomatoes during germination salt their reactions to stress. As study material, hybrid 5, 5 standards are used 10 different tomato varieties. The study was carried out with three repetitions as to be 25 seeds in each repetition, according to trial randomized complete block design. In the research, five different salt concentrations (0, 50 mM, 100 mM, 150 mM and 200 mM) were applied to tomatoes varieties and germination rate and germination speed of tomatoes were investigated. As result of study, it was found that different salt concentrations effected germination of tomato seeds, significantly. According to the findings of the study, germination rate varied between of 0% -100% and germination speed varied between 1.9 to 10.58 days. Besides, it was detected that 100mm NaCl application effected on the germination rate and 50 mm NaCl application on germination speed, negatively. According to study, it was found as variety 3 the most tolerant to salt taking the average of the varieties. That was followed variety 9 and variety 7. It was found as variety 5 the most sensitive to salt and was followed variety 4, variety 6 and 10 variety

Keywords: Salt stress; tomato; NaCl; mean germination time; germination rate

1. Giriş

Özellikle kurak ve yarı kurak iklime sahip bölgelerde, toprağın yıkanmasıyla yeraltı suyuna karışan çözünebilir

¹ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 38038 Kayseri, Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

*Sorumlu yazar E-posta: mehmetyaman@erciyes.edu.tr

tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun topraktan ayrılarak toprak yüzeyinde ve yüzeye yakın yerlerde birikmesi olayı tuzluluk olarak adlandırılır [1-3]. Tuzluluk bitkilerdeki abiyotik strese sebep olan en önemli faktörlerden birisidir [4]. Tuzluluğa karşı gerekli önlemler alınmadığı takdirde 2050 yılında dünya topraklarının yaklaşık

%50'si tuzluluk problemiyle karşı karşıya kalacaktır [5]. Tuzluluğa bağlı olarak ortaya çıkan tuz stresinin bitkilerde iki farklı şekilde ortaya çıktığı saptanmıştır. Bunlardan ilki kök bölgesinde çözünmüş tuz fazlalığına bağlı olarak bitkinin suyu topraktan alamaması, ikincisi ise bazı iyonların çözeltide fazla bulunması sonucu toksik etki oluşturması şeklindedir [6]. Tuzlu topraklarda, tohum çimlenmesi için gerekli olan su, tuz ozmotik çözeltisinde tutulur ve tohumun su alımı engellenerek su faydadan ziyade zarar sağlar. Tuz konsantrasyonunun artışı sadece tohumların çimlenmesini engellemez, aynı zamanda çimlenmenin başlamasını geciktirerek çimlenme süresini de uzatır [7].

Yetiştiriciliği yapılan pek çok kültür bitkisinde ve özellikle domateste tohum çimlenmesi ve erken fide gelişimi çevresel streslere en hassas dönemler olarak kabul edilmektedir [8]. Araziye yapılan tohum ekimlerinde toprak tuzluluğu; tohumun genotipik tepkisine, tuzluluğun derecesi ve süresine, toprağın su potansiyeline bağlı olarak çimlenmeyi geciktirmekte ya da engellemektedir. Dolayısıyla NaCl'nin, fide çıkışları ve tarladaki bitki sayısını azalttığı gibi ekonomik bir verim alınmasını tehlikeye sokmaktadır [9].

Amador ve ark. [10] tarafından farklı sebze türleri üzerinde yapılan çalışmada, bitkilerin tuza toleransının gelişme ile ilgili olduğu ve bitkinin bir gelişme safhasındaki dayanıklılık diğer safhalarındaki ile benzerlik göstermeyebileceğini belirlenmiştir. Böylece genotipler arasındaki genetiksel farklılığı belirlemek için tuza dayanıklılık çimlenme, çıkış, vegetatif ve genaratif gelişim safhalarında ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekir. Tuza dayanımı belirlemede herhangi bir karakterin seleksiyonu, mümkün olan en erken gelişim safhasında yapılmalıdır. Tohum çimlenmesi bitki gelişiminde ilk aşama olup tuza dayanıklılığı belirlemede ilk göstergedir.

Domates, Akdeniz ülkeleri ilk sırada olmak üzere, dünya çapında ekonomik olarak büyük öneme sahip bir bitkidir [11]. Domatesin tuza toleransı orta derecede olup (1,3 dS/m<doymuş toprak çözeltisinin elektriksel iletkenliği (EC)<6 dS/m), toprak tuzluluğunun görüldüğü alanlarda bile ekonomik olarak yetiştirilmektedir [12]. Birçok ticari domates çeşidi tohumu, çimlenmesi ve genç fide aşamasında toprak tuzluluğu gibi çevresel stres koşullarına hassastır [13,14]. Yapılan çalışmayla ticari önemi yüksek olan domates bitkisinin farklı çeşitlerinde çimlenme üzerine tuzun etkisini ve tuza olan tepkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

2. Materyal ve metod

Bu araştırma 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sebzeçilik laboratuvarında yapılmıştır. Deney materyali olarak kullanılan çeşitlerden 5 tanesi hibrit, 5 tanesi standart çeşit olmak üzere toplam 10 çeşit (çeşit 1, çeşit 2, çeşit 3, çeşit 4, çeşit 5, çeşit 6, çeşit 7, çeşit 8, çeşit 9, çeşit 10) domates kullanılmıştır. Çeşitlere ait bilgiler Çizelge 1'de yer almaktadır.

Tohumlar % 0,5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) ile yüzeysel sterilizasyon yapıldıktan sonra saf su ile iyice yıkanıp 9 cm çapındaki içerisinde filtre kâğıdı yerleştirilmiş olup (Whatman No:1) petri kaplarına, her birine 25 adet tohum gelecek şekilde konulmuştur. Denemede, tuz uygulaması olarak, 0, 50, 100, 150 ve 200 mM

konsantrasyonlarında 5 ml NaCl (Merc marka) petri kaplarına uygulanmıştır. Daha sonra petri kapları evapotrasprasyonu azaltmak için parafilmle kaplanmıştır. Takip eden deneme süresince, ilave çözelti kullanılmamıştır.. Böylece hazırlanan çimlendirme kapları, kapakları kapalı olarak iklim dolabına yerleştirilmiştir. İklim dolabında sıcaklık 25±1 °C olacak şekilde yapılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan çeşitlerin adları, orjinleri ve tipleri

Çeşit adı	Tipi	Orjini
Çeşit 1	Standart	Türkiye/Konya
Çeşit 2	F1 hibrit	İspanya/Barcelona
Çeşit 3	F1 hibrit	Türkiye/Antalya
Çeşit 4	F1 hibrit	Meksika
Çeşit 5	F1 hibrit	İsrail
Çeşit 6	F1 Hibrit	Peru
Çeşit 7	Standart	Türkiye/Elazığ
Çeşit 8	Standart	Türkiye/Konya
Çeşit 9	Standart	Türkiye/Konya
Çeşit 10	Standart	Türkiye/Malatya

Çimlenmiş tohumları tespit edebilmek için tohum sayım işlemi, tohumların iletildiği günü izleyen günden sonra ve her gün aynı saatlerde yapılmıştır. Sayım sırasında çimlenen tohumlar ortamdaki uzaklaştırılarak geriye kalanlar sayılmıştır. Toplamda 13 gün sayım yapılmıştır. Son sayım yapılarak çimlenen tohumların yüzde oranları hesaplanmıştır. Çimlenme için radikulanın testadan çıkmış olması esas kabul edilmiştir [15]. Mevcut çalışmada kullanılan hibrit çeşitlerde tohum azlığından dolayı her uygulamada 25 tohum kullanılmış ve deneyler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı yapılmıştır.

Yapılan denemeler sonunda elde edilen çimlenme değerlerinden yararlanılarak çimlenme süresi (gün/çimlenme) ve çimlenme oranı (%) hesaplanmıştır.

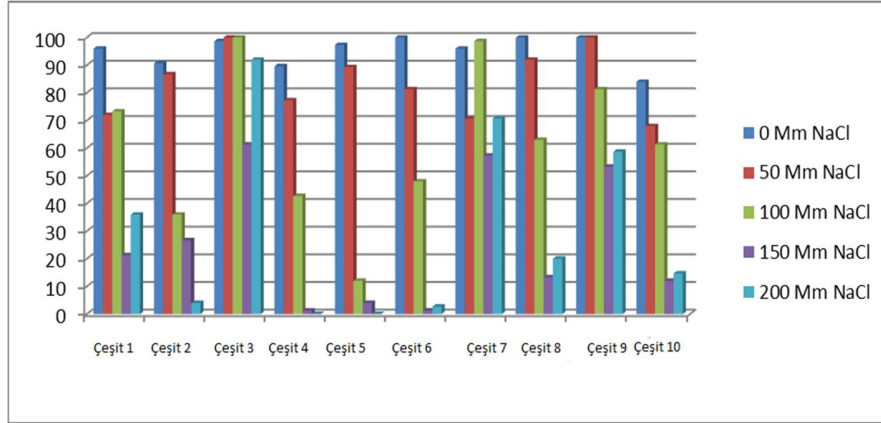
Çimlenme oranı(%): Uygun koşullarda belirli bir süre sonunda çimlenen tohumların oranı.

$$\text{Çimlenme Oranı} = \frac{\text{Çimlenen tohum sayısı}}{\text{Petrideki tohum sayısı}} \times 100 \quad (1)$$

Çimlenme süresi: Petri kaplarındaki tohumların çimlenmesi için geçen süre (tohumların petrilere yerleştirilmesinden 1 gün sonra sayım yapılarak, aşağıdaki gibi hesaplanır [10].

$$\text{Çimlenme Hızı} = \frac{\sum n (\text{sayımın yapıldığı gün çimlenen tohum sayısı}) \times \text{sayımını yapıldığı gün}}{\sum n (\text{Toplam çimlenmiş tohum sayısı})} \quad (2)$$

Tuz stresinin etkilerini karşılaştırmak amacıyla elde edilen veriler SAS paket programı kullanılarak, varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla 0,05 önem seviyesinde Duncan testi uygulanmıştır.



Şekil 1.Çeşitlere ait çimlenme oranları (%)

4. Bulgular ve tartışma

Çalışma sonunda domateste farklı tuz konsantrasyonlarında çimlenme oranlarını gösteren grafik Şekil 1’de verilmiştir. Kontrol (distile su) ortamında çimlenen tohumlarda çimlenme yüzdeleri birbirine yakın meydana gelirken, artan tuz stresi ortamında çimlenme yüzdesi gittikçe azalmıştır. NaCl Dozunun artması F1 hibrit çeşitlerinde tohum çimlenmesinde kontrole göre büyük farklılıklar oluşmazken standart çeşitlerde çimlenme oranı düşmüştür.

Artan NaCl, çimlenmeyi konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde azaltmıştır. Çimlenme oranları, 50 mM NaCl konsantrasyonda en düşük % 68, en yüksek % 100, 100 mM NaCl konsantrasyonda en düşük % 12, en yüksek % 100, 150 mM NaCl konsantrasyonda en düşük % 1,33, en yüksek % 61,33 ve 200 mM NaCl konsantrasyonunda en düşük %0, en yüksek %92 çimlenme gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, çimlenme oranı değerleri dikkate alındığında uygulamalar arasındaki fark çeşit 3 ve çeşit 7 hariç diğer çeşitlerde istatistiki anlamda önemli bulunmuştur. Çeşit 8, çeşit 6 ve H çeşit 9’un kontrol grubunda %100 çimlenme gerçekleşmiştir. Çeşit 3 istatistiki anlamda önemsiz bulunmuş ve 200 mM ‘da dahi %92 çimlenme göstermiştir. 200 mM tuz konsantrasyonunda Çeşit 4 ve Çeşit 5 hiç çimlenme göstermemiştir.

Uygulamalar bazında ortamlar dikkate alındığında en yüksek çimlenme oranı kontrol grubunda bulunurken 50 mM,100 mM ve 150 mM tuz konsantrasyonların da çimlenme oranı giderek düşmüş ancak 200 mM’da 150 Mm konsantrasyona göre artış gözlenmiştir. Çeşitlerin ortalamaları dikkate alındığında tuza en toleranslı çeşit çeşit 3 olarak bulunmuştur bunu çeşit 7 ve çeşit 9 izlemiştir. Tuza en hassas çeşit 5 olarak bulunmuş ve bunu çeşit 4, çeşit 6 ve çeşit 10 takip etmiştir.

Yapılan çalışmada çimlenme süresi dikkate alındığında, çeşit 2, çeşit 5, çeşit 6, çeşit 10 uygulamalar bazında istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Çalışmada en hızlı çimlenme kontrol grubunda 1.90 günde çimlenen çeşit 8’de gözlemlenmiştir. Bunu 2.19 günde çimlenen çeşit 9 ve 2.61 günde çimlenen çeşit 5 takip etmiştir. Bu çeşitte 200 mM’da çimlenme gözlemlenmiştir. 200 mM NaCl konsantrasyonunda en hızlı çimlenenin çeşit 7 olduğu elde edilen istatistiki sonuçlardan gözlemlenmiştir. Uygulamaların ortalamaları göz önüne alındığında kontrol grubunda en hızlı çimlenme gözlemlenmiş ve artan konsantrasyonla birlikte çimlenme süresi giderek yavaşlamıştır. Çeşitlerin ortalamaları dikkate alındığında en hızlı çimlenme yine 2.31 gün ile çeşit 8’de gerçekleşmiştir ve bunu 3,2 gün ile çeşit 5 ve çeşit 4, 3,31 gün ile çeşit 6 takip etmiştir.

Çizelge 2. Bazı domates çeşitlerinde farklı tuz konsantrasyonunda çimlenme süresi (gün)

Çeşit	0mMNaCl	50mMNaCl	100mMNaCl	150mMNaCl	200mMNaCl	Ortalama
Çeşit 1	3,19 c*	5,08 bc	5,03 bc	7,28 ab	9,11 a	5,94b **
Çeşit 2	4,34 ns	4,99	8,16	9,9	5	6,48ab
Çeşit 3	3,66bc**	2,60c	6,10ab	8,79a	8,69a	5,97b
Çeşit 4	3,94a**	5,29a	5,47a	1,33b	0b	3,20 c
Çeşit 5	2,61ns	4,82	4,91	3,67	0	3,20 c
Çeşit 6	3,03ns	2,93	4,64	2	4	3,31 c
Çeşit 7	6,42ns	5,4	8,09	8,21	10,58	7,75c
Çeşit 8	1,90ab**	2,44a	4,09a	3,13a	0b	2,31 c
Çeşit 9	2,19d**	3,43c	5,14b	9,70a	9,35a	5,96b
Çeşit 10	3,38ns	4,08	4,62	6,37	7,76	5,24 b
Ortalama	3,47 b**	4,11b	5,45a	5,63a	6,04a	

*: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0,05 seviyesinde önemlidir.

** : Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0,01 seviyesinde önemlidir.

Yapılan çalışma boyunca gerek standart gerek hibrit çeşitlerde çimlenme oranı ve çimlenme süresi çeşitler arasında farklılık göstermiştir. Bazı çeşitler tuzluluğa karşı hassas olmakla birlikte, bazıları ise tuzluluğa karşı dayanım göstererek çimlenme meydana gelmiştir.

En yüksek çimlenme NaCl etkisinin bulunmadığı kontrol uygulamasından elde edilmiştir. Bu bulguya paralel olarak, Doğan ve ark. [16], yaptıkları çalışmada, domates genotiplerinin çimlenme yüzdelisinde en yüksek kontrol koşullarından sağlamışlardır. Grieve ve ark.[17], tuzluluğun tohum üretimi ve gelişmeye olan etkilerini araştırarak, artan tuzlulukla birlikte tohum üretiminin önemli bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Kaynaş ve Erken [18], Rio Fuego domates tohumlarına 12mmhos/cm tuz konsantrasyonu uygulayarak bu tohumlardan %36,0 çimlenme elde etmiştir. Bazı domates. çeşitlerinde 100mM tuz konsantrasyonunun da %75 [19], hıyar çeşitlerinde ise 150mM tuz konsantrasyonu %90 a varan çimlenme kayıplarına sebep olmuştur [14].

Gucci ve ark. [20], Rush ve ark. [21], tarafından yapılan çalışmalarda tuzlu şartlarda en zararlı etkinin tohum çimlenmesi devresinde görüldüğünü ve yüksek tuz konsantrasyonlarının önemli derecede tohum çimlenmesini engellediğini ortaya koymuşlardır. Khavarinejad ve Mostofi [22], domates bitkisinin yapraklarında bulunan çözünbilir şekerlerin ve toplam sakkarit içeriğinin tuzluluk şartlarında önemli derecede arttığı, ancak nişasta içeriğinin tuzluluktan etkilenmediğini saptamışlardır. Yapılan deneme sonucunda çeşitlerin tuza olan farklı toleransları ortaya konmuştur. En iyi çimlenme kontrol(Saf su) ve 50 mM NaCl bulunan ortamlarda olmuştur. Yaptığımız çalışma sonucunda çeşitlerin ortalamaları dikkate alındığında tuza en toleranslı çeşit 3, çeşit 7 ve çeşit 9 olarak bulunmuştur.

4. Sonuç ve öneriler

Çeşitlerin ortalamaları dikkate alındığında tuza en toleranslı çeşit 3 olarak bulunmuştur. Bunu çeşit 7 ve çeşit 9 izlemiştir. Tuza en hassas çeşit Arzum olup olarak ve bunu çeşit5, çeşit 4 ve çeşit 6 takip etmiştir. Tuzluluk probleminin olduğu yerlerde tuza dayanıklı çeşit 3, çeşit 7 ve çeşit 9'un kullanılması önerilebilir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda Toreanlı bulunan tiplerde tuz ile ozmotik koşullandırma yapılmalı ve anaçlık özelliği araştırılmalıdır.

Kaynaklar

- [1] Ergene A., Toprak Bilgisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:267, Ders Kitapları Serisi No:42, Erzurum, 1982.
- [2] Kara T., Irrigation Scheduling to Present Soil Salinization from a Shallow Water Table, Acta Horticulture, Number 573, pp. 139-151, 2002.
- [3] Ekmekçi E., Apan, M., Kara, T., Tuzluluğun Bitki Gelişimine Etkisi. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2005,20(3):118-125, 2005.
- [4] Demirkaya M., Improvement in tolerance to salt stress during tomato cultivation, Turk J Biol . 38: 193-199, 2014.
- [5] Yayıcı O., Alikamanoglu S., Induction of salt-tolerant potato (*Solanum tuberosum* L.) mutants with gamma irradiation and characterization of genetic variations via RAPD-PCR analysis. Turk J Biol. 36: 405-412, 2012.
- [6] Dölarslan M., Gül E., "Toprak Bitki İlişkileri Açısından Tuzluluk", Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2012.

- [7] Rahman S, B., Ahmad J, Bakht., Shafi M., Response of various wheat cultivars to different salinity levels at early seedling stage. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3(7): 1190-1193, 2000.
- [8] Amini F., Ehsanpour A, A., Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to MS, water agar and salt stress in in vitro culture. Asian Journal of Plant Science, 9(1), 170-175, 2006.
- [9] Cuartero J., Muñoz R, F., Tomato and salinity. Scientia Horticulturae78,83-125, 1999.
- [10] Murillo-Amador B., Lopez-Aguilar R., Kaya C., Larrinaga-Mayoral, J., Flores-Hernandez A., Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. J.Agronomy and Crop Science. 188: 235-247, 2002.
- [11] Amini F., Ehsanpour A, A., Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 1(4), 204-208, 2005.
- [12] Yokaş İ., Tuna A, L., Bürün B., Altunlu, H., Altan F., Kaya C., Responses of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant to exposure to different salt forms and rates. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 32, 319-329, 2008.
- [13] Maas E,V., Salt tolerance of plants. Applied Agricultural Research 1:12-26, 1986.
- [14] Foolad M,R., Response to selection for salt tolerance during germination in tomato seed derived from P.I. 174263. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121: 1006-1011, 1996.
- [15] Chartzoulakis K., Klapaki G., Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. Scientia Horticulturae, 86: 247-260, 2000.
- [16] Doğan M., Avu A., Can E, N., Aktan A., Farklı domates tohumlarının çimlenmesi üzerine tuz stresinin etkisi. SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi. Fen Dergisi (E-dergi), 3(2): 174-182, 2008.
- [17] Grieve C, M., Grattan S,R., Mineral Nutrient Acquisition and Response by Plants Grown in Saline Environments. Handbook of Plant and Crop Stress. 9: 203-229, 1999.
- [18] Kaynaş N., Erken N, T., Farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarının bazı sebze türlerinin çimlenmesi üzerine etkileri. V.Sebze Tarımı Sempozyumu 21-24 Eylül 2004, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Çanakkale, 235-238 s, 2004.
- [19] Passam H,C., Kakouriotis D., The effects of osmoconditioning on the germination, emergence and early plant growth of cucumber under saline conditions. Sci. Hortic. 57: 233-240, 1994.
- [20] Gucci G., De Caro A., Ciciretti, L., Leoni, B., Salinity and seed germination of some vegetable crops. Acta Horticulturae, 26 (3):246- 249, 1994.
- [21] Rush M,A., Rios S., Olmos E., Santa-Cruz A., Bolarin C,M., Long-term culture modifies the salt responses of callus lines of salt-tolerant and saltsensitive tomato species. Journal Plant Physiology, 157, 413-420,2000.

- [22] Khavari-Nejad R,A., Mostofi Y., Effect of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars, *Photosynthetica*, 35:151-154, 1998.



Türk Doğa ve Fen Dergisi Turkish Journal of Nature and Science

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/>



Yerel ekmeklik buğday populasyonundan seçilmiş saf hatlarda bazı özelliklerarası ilişkilerin belirlenmesi

Hasan Kılıç¹, Mevlüt Akçura², Rıdvan Uçar³, Hüsnü Aktaş⁴, Kağan Kökten¹, Sertaç Tekdal⁵

Özet

Bu araştırma, ekmeklik buğday yerel populasyonlarından (Doğu Geçi Bölgesi, Bingöl) seçilen saf hatların Diyarbakır ekolojik şartlarında bazı morfolojik özelliklerinin belirlenmesi ve incelenen özellikler arasındaki ilişkilerin genotip-karakter (GK) biplot analizi ile yorumlanması amacıyla yürütülmüştür. Araştırmada materyal olarak Bingöl ili ilçelerine ait 39 lokasyondan toplanan yerel ekmeklik buğday populasyonlarından seçilen 181 yerel ekmeklik buğday hattı kullanılmıştır. Deneme 1 m x 2 sıra parsel boyutunda 2013-2014 yetiştirme sezonunda GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Diyarbakır Merkez deneme arazisinde yağışa dayalı şartlarda yürütülmüştür. Çalışmada bitki boyu (BB) 67,7-108,8 cm; başaklanma süresi (BS) 121-139 gün, üst boğum arası uzunluğu (PU) 0,2-14,1 cm; başakta tane sayısı (BTS) 10,95-38,58 adet; başakta tane ağırlığı (BTA) 0,28-1,4 g; bayrak yaprak klorofil içeriği (SPAD) 40,0-54,4; bin tane ağırlığı (BİNTA) 20,03-40,42 g. ve normalize edilmiş vejetasyon indeksi (NDVI) 0,20-0,80 arasında değişim göstermişlerdir. İncelenen özellikler arasındaki ilişkiler biplot analiz metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Biplot analizi sonucunda BİNTA, BTS ile BTA aynı grupta yer alırken, PU ile SPAD ayrı bir grubu oluşturmuştur. BB, BS ile NDVI değerleri ise yalnız başına farklı gruplarda yer almışlardır. Araştırma sonuçlarına göre incelenen özellikler bakımından uygun görülen genotipler yağışa dayalı şartlara uygun ekmeklik buğday çeşit geliştirme çalışmalarına katkı sağlamak üzere genetik materyal olarak değerlendirilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Biplot; korelasyon analizi; klorofil içeriği; NDVI; saf hat; yerel ekmeklik buğday

Determination of relationship of some traits of pure lines selected from populations of landraces bread wheat

Abstract

This study was carried out to determine some yield components and physiological traits of 181 bread wheat pure lines which are selected from Turkish bread wheat landraces (collected from Eastern Transitional Zone of Bingöl) under Diyarbakır condition. Genotype-traits (GT) biplot analysis was used to investigate the relationships between used traits. The experiments was conducted in 2013-2014 growing seasons, in Gap International Agricultural Research And Training Center under rain fed conditions, with 1 m x 2 rows. In the study, values of the genotypes changed between 67.7-108.8 cm for plant height, 121-139 day for heading time, 0.2-14.1 cm peduncle length, 10.95-38.58 for number of grains spike⁻¹, 0.28-1.4 g for weight of grains spike⁻¹, 40.0-54.4 for chlorophyll content (SPAD), 20.03-40.42 g for thousand kernel weight and 0.20-0.80 for Normalized Difference Vegetation Index (NDVI). Genotype-traits (GT) biplot analysis was used to investigate and display the relationships between 9 traits. When all traits were evaluated using the biplot analysis thousand kernel weight, number of grains spike⁻¹ and weight of grains spike⁻¹ were involved in the same group, while chlorophyll content and peduncle length were grouped in two different groups. However, plant height, NDVI and heading date were involved individually in separate groups. Genotypes showing appropriate combination based on the studied parameters may be used by the breeders of Turkish in wheat improvement programs under rainfed conditions which would help in developing genetically improved new cultivars.

Keywords: Biplot; correlation analyses; chlorophyll content; pure line; NDVI; bread wheat landraces

1. Giriş

Buğdayın gen merkezi olarak kabul edilen Anadolu'da yüz yıllardır yetiştirilmekte olan yerel buğday

¹ Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bingöl, Türkiye

¹ Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Çanakkale, Türkiye

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji, Kahramanmaraş, Türkiye

¹ Mardin Artuklu Üniversitesi, Kızıltepe Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Mardin, Türkiye

¹ GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi, Diyarbakır, Türkiye

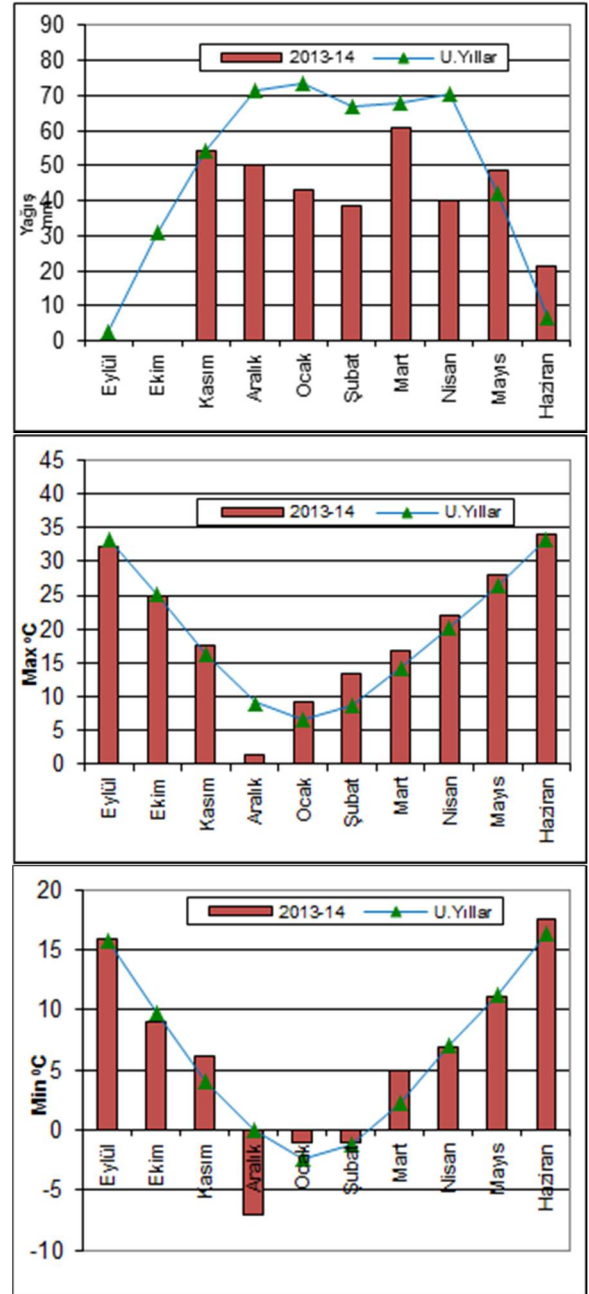
*Sorumlu yazar E-posta: hkili@bingol.edu.tr

poulasyonlarına ait araştırmalar sayılıdır [1]. Bitki gen kaynaklarından çeşit geliştirme çalışmalarında önemli potansiyele sahip yerel populasyonların üretimden kalkmalarının en büyük sebeplerinden biri de tescilli çeşitlerin yaygın bir şekilde ekilmesidir. Günümüzde tüm Anadolu'da olduğu gibi Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde de yerel buğday populasyonlarının ekim alanlarına rastlamak oldukça zordur. Ancak çok sayıda

araştırmacı tarafından Anadolu'nun farklı yerlerinden toplanan yerel popülasyonlarda yeterli varyasyonun mevcut olduğuna dair çok sayıda çalışma bildirilmekle birlikte [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.] yerel zenginliğimizin yeterince değerlendirildiği söylenemez. Son yıllarda sanayicinin artan kaliteli buğday talepleri ıslahçıları kalite geliştirmeye yöneltmiştir. Günümüzde yüksek ekmek hacmine sahip ve iyi çevre şartlarına uyumlu çok sayıda çeşit piyasaya sunulmuştur. Hastalıklara hassas olmaları sebebiyle yoğun bir şekilde melezlemelerde kullanılmayan yerel hatlardaki sıcağa ve kurağa mukavemet özelliklerinin küresel ısınma sonucu istikrarsız hale gelen iklim şartlarında değerlendirilmeleri günümüzde büyük önem kazanmaktadır. Yüzlerce yıl tabii şartlarda hayatiyetlerini devam ettiren yerel popülasyonların gelecekte meydana gelebilecek ani ve istikrarsız hava şartları için sigorta vazifesi görebileceğini göz ardı etmemek gerekir. Islah çalışmalarında özellikler arası ilişkilerin önceden bilinmesi araştırmacılara zaman ve işgücü gibi ekonomik faydalar sağladığı gibi ıslah programlarının etkinliğini artırmaktadır [10]. Biplot analiz yöntemi ilk defa [11] tarafından kullanıldıktan sonra, iktisat, işletme, sosyoloji, tıp, ekolojik ve genetik gibi bir çok bilim dalında kullanılmıştır [12]. Genotip ile özellikler arası ilişkileri görsel olarak ifade eden biplot analiz yöntemi ve grafiği bitki ıslahı konusunda çalışma yapan araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır [12, 7; 13, 14 ve 15]. Bu araştırma Doğu Geçit Bölgesi olarak kabul edilen Bingöl il ve ilçelerinden toplanan 39 yerel ekmeklik buğday popülasyonundan elde edilen 181 saf hattın bazı özellikler yönünden tanımlanması ve özellikler arası ilişkilerin tespit edilmesi amacıyla Diyarbakır yağışa dayalı şartlarında yürütülmüştür.

2. Materyal ve metot

Bu çalışmanın başlangıç materyalini 2011 yılında Bingöl il ve ilçelerinin dağlık köylerinden toplanan yerel ekmeklik buğday numuneleri oluşturmuştur. Bu örneklerden saf hat seleksiyon yöntemi [1, 22] kullanılarak hat seçimi yapılmıştır. Seçilen hatlardan 181 tanesi bu araştırmada deneme materyali olarak değerlendirilmiştir. Deneme 2013-2014 yetiştirme sezonunda GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi deneme tarlalarında (37° 56' 41 K; 40° 15' 01 D, 599 m yükselti) yağışa dayalı şartlarda her hat 1 m x 2 sıra olacak şekilde güz yağışları sonrası kasım ayında elle ekim yapılmıştır. Deneme yeri toprakları hafif alkali (7,43), organik madde bakımından fakir (%1,13), kireçli (% 29,6) ve fosfor (P₂O₅) bakımından orta (4,72 kg/da), potasyum (K₂O) bakımından zengin (144,7 kg/da) durumdadır. Araştırmanın yürütüldüğü 2013-2014 yılına ait bazı iklim verileri Şekil 1'de verilmiştir. Diyarbakır ili uzun yıllar yağış miktarı 487,4 mm iken 2013-2014 yetiştirme sezonunda kaydedilen yağış miktarı 356,7 mm de kalmıştır. Özellikle dane doldurma dönemlerinde kaydedilen yağış miktarının uzun yıllara göre düşük olduğu görülmektedir. Deneme alanına, yetiştirme yılında saf madde üzerinden 12 kg/da azot (N) ile 10 kg/da fosfor (P₂O₅) uygulanmıştır. Fosforun tamamı ile azotun yarısı ekimle, kalan azotun yarısı da sapa kalkma döneminde verilmiştir. Hasat olgunluğuna gelen parsellerde hasat, orakla ile biçilerek tek başak harman makinesinde tanelenmiştir. Sarı pas hastalık testleri yapay epidemi altında değerlendirilmiştir. Sarı pas hastalık değerlendirilmeleri Modifiye edilmiş Cobb skalası [16] kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon değerlendirmeleri hassas çeşit 80-90 S düzeyine ulaştığında, en az 2 defa yapılmıştır. Değerlendirmelerde pas şiddeti % olarak, enfeksiyon R, MR, MS ve S şeklinde kaydedilmiştir. Ancak iklim şartları yönünden hastalığa uygun ortam oluşmadığından çok hassas genotipler dışında epidemi gelişmemiştir.



Şekil 1. Deneme yeri aylık yağış, maksimum ve minimum sıcaklık değerleri

Çalışmada başaklanma süresi (BS), üst boğum arası uzunluğu (PU), bin tane ağırlığı (BİNTA), başakta tane sayısı (BTS) ve başak tane ağırlığı (BTA) incelenmiştir. Normalize edilmiş vejetasyon indeksi (NDVI) değeri; Parselde bitkilerin kapladığı toplam alanı ölçen *Greenseeker Handheld Crop Sensor Trimble* isimli optik el sensörü kullanılarak sapa kalkma ve başaklanma dönemlerinde 12:00-13:00 saatleri arasında ölçülmüştür [17]. Yeşil bitki örtüsünün fazla olduğu yerlerde NDVI değeri +1 değerine yaklaşırken, çıplak toprak ve zayıf vejetasyon gelişiminde ise sıfıra yakın değer göstermektedir.

Klorofil Ölçümü: Klorofil içeriğinin belirlenmesinde Minolta SPAD-502 cihazı kullanılmıştır. Cihazın ölçüm aralığı 1-100 arası olup, seçilen bayrak yaprak açılıp kapanabilen ağzına sıkıştırılmak suretiyle okumalar yapılmıştır. Klorofil içeriğinin tespitinde [18] bitkinin bayrak yaprağının orta kısmı seçilmiştir. Başaklanma döneminde yaklaşık olarak 10 kadar örnek ortalama alınmak suretiyle ortalama değerler bulunmuştur. Özellikler

arası görsel ilişkiyi ifade eden genotip-karakter (GK) biplot analizi [19] ve [5]' e göre, GenStat 14th paket programı, elde edilen sonuçların normal dağılım analizi ise JMP-5 SAS [20] istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Yerel ekmeçlik buğday saf hatlarında ele alınan özelliklere ait değerler Çizelge 1'de, değişim katsayıları ise

Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 1 ve Çizelge 2'de görüldüğü gibi genotiplerin bitki boyları 67.7-108.8 cm; başaklanma süresi 121-139 gün; üst boğum arası uzunluğu 0.2-14.1 cm; başakta tane sayısı 10.95-38.58 adet; başakta tane ağırlığı 0.28-1.4 g; bayrak yaprak klorofil içeriği 40.0-54.4; bin tane ağırlığı 20.03-40.42 g; sapa kalkma dönemindeki NDVI değeri 0.72-0.83 ve başaklanma dönemindeki NDVI değeri 0.20-0.80 arasında değişmiştir.

Çizelge 1. Yerel saf hat buğdaylarda belirlenen özelliklere ait değerler

Genotip	NDVI-1	NDVI-2	BB cm	SPAD	BS gün	PU cm	BTS adet	BTA g.	BİNTA g.	TR	Sarı pas
G1	0,77	0,76	78,7	46,3	132	3,0	31,05	0,92	29,0	beyaz	
G2	0,81	0,75	84,2	45,3	130	7,6	19,05	0,58	37,2	kırmızı	
G3	0,79	0,75	78,4	44,8	130	2,6	21,63	0,66	31,4	kırmızı	
G4	0,78	0,79	81,2	44,3	133	1,4	29,21	0,85	32,1	beyaz	
G5	0,78	0,76	84,3	46,2	133	0,3	22,74	0,75	32,9	beyaz	
G6	0,81	0,75	77,8	47,6	133	0,7	21,11	0,68	31,2	beyaz	
G7	0,78	0,76	75,5	45,6	132	2,2	32,79	0,97	37,3	beyaz	
G9	0,78	0,83	73,7	44,4	128	4,2	24,58	0,70	24,9	kırmızı	
G10	0,81	0,81	74,1	46,0	124	5,7	28,53	0,85	39,7	kırmızı	
G11	0,81	0,71	75,1	47,5	121	7,6	31,79	1,00	36,1	beyaz	
G12	0,82	0,79	80,1	46,3	121	7,7	25,16	0,67	30,1	beyaz	
G13	0,79	0,79	81,8	46,6	121	10,6	22,05	0,67	31,0	kırmızı	
G14	0,82	0,78	75,2	45,3	121	8,5	25,16	0,71	25,3	kırmızı	
G15	0,81	0,79	82,6	46,6	123	5,9	36,84	1,20	32,3	kırmızı	
G16	0,80	0,80	88,8	49,3	124	9,1	38,58	1,27	32,6	kırmızı	
G17	0,77	0,83	82,0	48,4	124	6,0	33,05	0,96	27,8	kırmızı	
G18	0,80	0,82	83,5	44,6	132	0,2	27,42	0,80	32,8	beyaz	
G19	0,78	0,64	89,7	45,0	133	4,1	31,58	0,94	29,0	beyaz	
G20	0,76	0,73	80,3	45,7	134	1,9	26,95	0,82	28,5	beyaz	
G21	0,77	0,70	78,9	46,9	135	1,1	25,05	0,70	25,0	kırmızı	
G22	0,79	0,71	80,7	43,9	135	2,3	28,32	0,70	27,6	kırmızı	
G23	0,81	0,77	73,9	44,4	136	0,9	18,16	0,51	24,4	kırmızı	
G24	0,77	0,79	87,7	45,9	134	3,4	15,26	0,89	33,8	kırmızı	
G25	0,80	0,59	98,3	48,3	130	9,4	27,21	0,96	36,9	kırmızı	
G26	0,80	0,72	79,4	45,5	132	4,6	31,58	0,94	40,4	beyaz	
G27	0,81	0,75	86,4	47,7	131	4,1	18,68	0,56	29,4	kırmızı	
G28	0,81	0,75	83,9	46,7	130	3,1	17,26	0,46	23,9	kırmızı	
G29	0,80	0,70	72,9	45,6	131	0,7	16,16	0,50	26,4	kırmızı	
G30	0,81	0,62	69,4	44,4	136	3,2	20,53	0,65	32,8	beyaz	
G31	0,78	0,70	71,3	47,6	136	2,3	25,47	0,81	29,4	beyaz	
G32	0,80	0,79	77,2	45,2	135	3,4	23,53	0,69	27,6	beyaz	
G33	0,81	0,62	87,7	48,2	137	1,4	22,42	0,55	21,6	kırmızı	
G34	0,83	0,72	90,0	47,3	134	5,2	28,26	0,72	26,3	kırmızı	
G35	0,81	0,60	67,7	46,4	137	1,5	21,53	0,80	27,8	kırmızı	
G36	0,81	0,72	84,5	48,2	134	3,0	32,00	1,00	29,4	kırmızı	
G37	0,77	0,47	89,2	46,4	133	3,4	35,42	1,20	35,3	kırmızı	
G38	0,77	0,76	85,7	46,4	134	3,5	21,37	0,64	28,8	kırmızı	
G39	0,79	0,46	97,9	48,9	130	6,0	18,05	0,56	32,7	beyaz	
G40	0,81	0,81	80,5	45,6	130	7,6	23,74	0,78	33,8	beyaz	
G41	0,77	0,79	69,2	41,5	132	3,5	26,95	0,69	25,2	beyaz	
G42	0,77	0,76	75,0	45,8	125	3,3	21,95	0,77	31,3	beyaz	
G43	0,76	0,75	81,0	45,1	126	2,9	22,11	0,67	28,3	beyaz	
G44	0,77	0,57	79,4	46,1	125	3,2	26,26	0,79	30,7	beyaz	80S
G45	0,79	0,73	84,5	42,9	133	2,9	22,42	0,68	30,5	kırmızı	
G46	0,80	0,63	75,7	45,9	136	2,1	18,47	0,61	29,6	beyaz	
G47	0,80	0,71	88,3	43,6	133	2,7	16,63	0,58	24,1	kırmızı	
G48	0,81	0,77	73,6	40,0	135	3,0	15,42	0,51	29,7	beyaz	
G49	0,80	0,75	80,6	43,2	134	4,8	23,00	0,73	31,0	beyaz	
G50	0,81	0,59	78,0	44,4	135	4,0	15,47	0,50	27,2	beyaz	
G51	0,80	0,75	77,7	47,1	135	4,5	19,00	0,65	30,9	kırmızı	
G52	0,80	0,70	83,3	43,8	134	5,6	20,16	0,59	26,7	kırmızı	
G53	0,77	0,50	88,4	46,3	136	6,9	26,05	0,79	29,5	kırmızı	
G54	0,77	0,76	91,6	50,2	126	10,9	18,37	0,62	29,2	beyaz	

NDVI: Normalize edilmiş vejetasyon indeksi, BB: Bitki boyu; BS: başaklanma süresi, PU: Peduncle (üst boğum) uzunluğu, BTS: Başakta tane sayısı, BTA: Başakta tane ağırlığı, BİNTA: Bin tane ağırlığı, TR: Tane rengi

Çizelge1. (Devamı)

Genotip	NDVI-1	NDVI-2	BB cm	SPAD	BS gün	PU cm	BTS adet	BTA g.	BİNTA g.	TR	Sarı pas
G55	0,75	0,71	102,5	52,6	123	14,1	23,68	0,73	29,4	beyaz	
G56	0,80	0,76	96,7	54,4	127	13,1	18,68	0,60	25,9	beyaz	
G57	0,72	0,73	79,9	47,4	134	5,4	26,37	0,75	29,0	kırmızı	
G58	0,76	0,73	77,3	43,9	134	5,9	17,37	0,54	26,8	beyaz	
G59	0,75	0,72	81,5	45,6	135	7,0	20,37	0,57	27,6	beyaz	
G60	0,73	0,65	80,1	46,1	137	0,6	22,74	0,65	26,9	kırmızı	
G61	0,77	0,62	72,8	42,9	137	3,8	22,84	0,69	27,6	kırmızı	
G62	0,78	0,66	72,9	41,7	137	4,3	23,26	0,75	31,4	kırmızı	
G63	0,79	0,78	77,7	47,0	123	8,4	37,89	1,40	33,8	kırmızı	
G64	0,78	0,79	82,6	44,9	123	8,2	31,32	1,05	29,7	kırmızı	20MS
G65	0,78	0,58	87,5	46,6	122	12,7	36,58	1,17	30,7	kırmızı	
G66	0,80	0,49	89,8	41,8	123	10,8	38,47	1,21	30,2	kırmızı	
G67	0,79	0,66	87,4	42,8	135	3,6	10,95	0,50	30,4	kırmızı	
G68	0,82	0,64	92,6	42,4	135	4,1	16,53	0,50	30,3	beyaz	
G69	0,80	0,68	80,2	47,0	136	3,5	20,26	0,63	28,9	kırmızı	
G70	0,81	0,71	89,2	43,8	136	2,0	18,63	0,53	26,7	kırmızı	
G71	0,82	0,71	85,8	44,9	135	3,6	14,74	0,42	25,2	kırmızı	
G72	0,79	0,72	83,8	42,6	137	4,6	15,74	0,54	31,2	kırmızı	
G73	0,78	0,68	82,2	41,9	134	7,1	17,00	0,55	31,2	kırmızı	
G74	0,81	0,63	87,4	43,2	137	6,2	24,58	0,76	31,2	beyaz	
G75	0,79	0,74	87,8	46,8	137	5,5	18,79	0,58	28,0	kırmızı	
G76	0,81	0,69	96,6	45,5	134	8,9	16,89	0,53	27,1	kırmızı	
G77	0,77	0,64	90,8	46,4	137	1,5	16,47	0,46	23,4	kırmızı	
G78	0,79	0,76	92,4	44,6	135	2,3	18,74	0,59	29,3	beyaz	10 MS
G79	0,78	0,50	95,0	45,4	135	6,0	31,58	0,90	31,0	beyaz	
G80	0,79	0,72	93,0	42,8	135	8,8	18,63	0,61	31,8	beyaz	
G81	0,77	0,75	84,0	44,7	138	5,5	22,84	0,66	27,0	kırmızı	
G82	0,79	0,77	81,4	49,1	134	2,6	15,58	0,43	26,0	kırmızı	
G83	0,75	0,70	80,6	47,4	133	3,3	18,47	0,59	29,8	kırmızı	
G84	0,77	0,74	87,4	45,6	134	3,9	22,47	0,71	27,1	beyaz	
G85	0,75	0,73	87,8	46,4	134	2,9	23,11	0,74	34,1	beyaz	
G86	0,76	0,71	91,2	49,3	135	3,1	23,16	0,65	23,2	kırmızı	
G87	0,79	0,67	82,4	45,3	133	4,4	22,42	0,66	23,0	kırmızı	
G88	0,81	0,60	88,2	42,7	134	4,5	19,79	0,66	30,8	kırmızı	
G89	0,77	0,80	79,8	47,9	135	2,4	25,68	0,74	28,2	kırmızı	
G90	0,79	0,78	82,6	47,3	132	2,4	19,89	0,74	30,4	beyaz	
G91	0,82	0,76	74,6	46,7	133	2,8	24,37	0,77	26,2	beyaz	
G92	0,79	0,67	81,4	45,6	136	3,8	20,84	0,63	33,0	beyaz	
G93	0,81	0,50	89,4	45,5	136	1,3	23,21	0,67	27,9	kırmızı	
G94	0,80	0,20	96,8	45,7	138	4,6	27,42	0,88	32,6	beyaz	
G95	0,77	0,70	93,2	43,6	134	6,3	15,63	0,50	27,6	kırmızı	
G96	0,78	0,63	95,4	42,2	135	7,5	24,53	0,78	32,6	beyaz	
G97	0,76	0,39	95,0	46,2	138	4,2	28,58	0,78	26,2	kırmızı	
G98	0,75	0,71	96,0	46,2	135	5,0	24,63	0,79	38,2	kırmızı	
G99	0,79	0,70	93,6	43,8	134	4,2	23,11	0,71	32,1	kırmızı	
G100	0,75	0,67	88,6	42,8	131	9,1	19,37	0,59	28,0	beyaz	
G101	0,72	0,68	88,0	47,6	134	6,8	19,74	0,60	28,0	beyaz	
G102	0,79	0,57	90,0	44,4	134	6,8	23,00	0,77	31,0	beyaz	
G103	0,80	0,61	102,4	49,7	133	10,1	24,58	0,75	27,1	kırmızı	
G104	0,80	0,71	98,0	46,7	134	5,7	27,74	0,77	27,5	kırmızı	
G105	0,78	0,65	98,8	47,2	135	6,1	25,79	0,81	30,6	kırmızı	
G106	0,79	0,55	93,4	43,3	135	5,6	27,63	0,84	31,3	kırmızı	20 S
G107	0,80	0,58	95,6	45,0	136	5,0	24,26	0,77	30,9	beyaz	
G108	0,80	0,67	93,2	45,1	138	6,8	18,21	0,57	28,4	kırmızı	20 MS
G109	0,79	0,50	98,2	44,8	138	8,0	25,37	0,80	29,8	kırmızı	10 MS
G110	0,80	0,52	102,6	47,5	138	3,0	31,84	0,94	28,7	kırmızı	
G111	0,78	0,70	81,4	46,3	139	2,9	21,05	0,64	28,4	kırmızı	
G112	0,79	0,74	92,4	46,2	135	6,0	26,53	0,82	29,8	kırmızı	
G113	0,78	0,79	96,6	47,2	135	3,9	24,11	0,67	24,8	kırmızı	
G114	0,77	0,65	91,4	49,1	134	8,7	26,26	0,80	26,8	kırmızı	
G115	0,80	0,69	94,0	46,8	134	7,1	20,37	0,64	30,2	beyaz	
G116	0,77	0,52	83,4	43,9	138	3,1	24,89	0,82	37,2	beyaz	
G117	0,80	0,55	88,4	45,0	137	1,5	22,26	0,63	22,7	kırmızı	
G118	0,81	0,76	98,2	48,4	137	2,4	17,42	0,45	21,4	kırmızı	

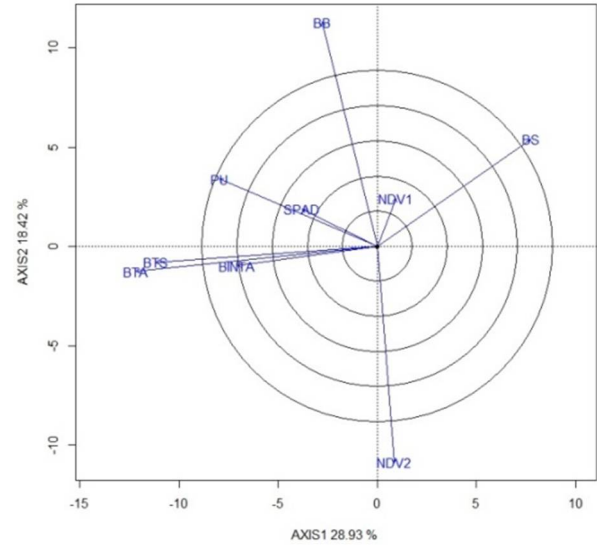
Çizelge1. (Devamı)

Genotip	NDVI-1	NDVI-2	BB cm	SPAD	BS gün	PU cm	BTS adet	BTA g.	BİNTA g.	TR	Sarı pas
G119	0,79	0,69	95,6	45,6	138	0,4	22,21	0,65	27,7	kırmızı	
G120	0,77	0,72	94,6	47,6	134	5,8	23,47	0,72	34,9	kırmızı	
G121	0,80	0,74	82,2	43,4	134	2,5	16,74	0,49	26,8	beyaz	
G122	0,81	0,71	83,2	47,5	124	4,9	18,95	0,55	26,1	kırmızı	
G123	0,81	0,77	85,6	43,0	134	1,9	18,74	0,59	31,1	beyaz	
G124	0,82	0,75	77,0	47,2	134	0,4	15,00	0,43	33,6	kırmızı	
G125	0,81	0,69	97,8	45,8	125	2,2	30,53	0,85	31,6	kırmızı	
G126	0,82	0,75	89,4	47,9	136	2,4	23,95	0,70	29,3	kırmızı	
G127	0,80	0,50	92,6	42,5	135	8,9	21,68	0,74	35,4	beyaz	
G128	0,77	0,77	87,2	41,0	134	4,9	20,32	0,66	34,0	beyaz	
G129	0,79	0,76	80,2	46,2	134	6,7	21,11	0,65	31,9	beyaz	
G130	0,81	0,83	78,2	45,2	133	1,3	17,74	0,43	20,0	kırmızı	
G131	0,80	0,55	84,2	43,6	133	3,3	23,05	0,66	25,8	kırmızı	
G132	0,77	0,72	86,2	43,0	124	1,0	22,63	0,65	30,1	kırmızı	
G133	0,77	0,82	98,6	46,3	122	4,7	18,95	0,60	26,0	beyaz	
G134	0,80	0,66	93,6	45,4	122	8,8	14,05	0,86	32,5	beyaz	
G135	0,81	0,64	98,6	44,5	122	10,3	32,00	1,02	31,2	beyaz	
G136	0,82	0,73	99,0	47,7	123	7,3	26,89	0,90	32,5	kırmızı	10MS
G137	0,81	0,69	97,2	46,0	124	5,4	24,21	0,66	23,0	kırmızı	
G138	0,80	0,73	96,2	49,7	135	5,2	22,00	0,63	22,6	kırmızı	
G139	0,82	0,35	103,2	44,7	138	6,6	24,53	0,72	28,2	kırmızı	
G140	0,80	0,61	92,0	45,3	138	5,0	20,79	0,63	31,1	kırmızı	
G141	0,82	0,71	100,2	46,7	135	7,1	24,79	0,74	27,6	kırmızı	
G142	0,80	0,56	104,0	47,0	135	8,4	22,05	0,70	27,0	kırmızı	
G143	0,79	0,52	99,4	47,9	134	3,8	19,26	0,56	30,0	kırmızı	
G144	0,80	0,76	93,4	46,8	135	0,8	16,53	0,48	26,1	kırmızı	
G145	0,81	0,51	99,8	50,2	130	3,9	25,63	0,85	38,0	beyaz	
G146	0,79	0,40	102,8	46,2	131	5,1	21,37	0,71	35,6	beyaz	
G147	0,80	0,71	88,6	47,1	130	6,4	22,79	0,71	33,3	beyaz	
G148	0,77	0,63	101,8	48,1	132	4,1	25,63	0,93	32,3	kırmızı	
G149	0,80	0,55	101,0	46,9	130	4,6	19,37	0,59	25,9	kırmızı	
G150	0,80	0,33	98,6	48,7	132	3,4	16,68	0,53	25,5	beyaz	
G151	0,78	0,76	88,4	48,7	132	1,2	26,68	0,74	26,0	kırmızı	
G152	0,79	0,67	94,8	43,2	133	3,2	13,11	0,28	21,4	kırmızı	
G153	0,74	0,47	94,2	50,6	127	4,1	18,37	0,58	27,8	kırmızı	
G154	0,80	0,67	103,0	47,0	130	6,1	24,63	0,76	30,7	kırmızı	
G155	0,78	0,76	91,6	45,9	132	3,8	30,79	0,92	28,6	beyaz	
G156	0,80	0,65	92,4	44,7	130	4,5	28,47	0,94	25,5	beyaz	
G157	0,82	0,57	98,0	44,4	136	9,1	20,42	0,62	27,1	beyaz	
G158	0,78	0,72	94,8	43,9	134	5,7	19,89	0,59	28,3	beyaz	
G159	0,77	0,69	95,4	45,8	137	5,3	21,68	0,68	29,7	kırmızı	
G160	0,81	0,70	97,6	47,3	135	5,0	27,79	0,80	28,8	kırmızı	
G161	0,81	0,72	98,6	46,8	138	3,6	26,58	0,83	29,5	kırmızı	
G162	0,81	0,73	99,4	44,7	138	0,7	23,32	0,67	29,4	kırmızı	
G163	0,81	0,58	93,0	46,9	134	1,4	19,42	0,57	27,8	kırmızı	
G164	0,80	0,58	98,4	45,0	134	6,7	24,26	0,74	31,7	beyaz	20 S
G165	0,80	0,56	95,8	44,5	134	2,8	23,58	0,68	29,6	kırmızı	
G166	0,78	0,60	82,6	45,3	133	1,1	17,68	0,57	30,1	kırmızı	20 MS
G167	0,82	0,57	94,4	47,9	138	2,0	15,79	0,44	28,9	kırmızı	10 MS
G168	0,75	0,67	95,8	48,1	136	5,9	25,58	0,78	27,7	kırmızı	10 MS
G169	0,77	0,44	90,0	44,4	136	4,1	21,47	0,64	28,9	kırmızı	
G170	0,80	0,45	91,8	46,1	138	4,6	19,84	0,65	32,3	kırmızı	
G171	0,79	0,59	85,2	44,9	138	2,7	15,32	0,44	29,8	kırmızı	
G172	0,80	0,61	86,4	43,1	138	2,6	23,11	0,64	26,3	kırmızı	
G173	0,79	0,62	73,8	42,3	137	0,5	15,84	0,43	22,4	kırmızı	
G174	0,81	0,72	93,6	42,5	132	6,2	17,21	0,54	31,1	kırmızı	
G175	0,82	0,56	99,4	45,5	138	0,7	21,84	0,60	27,1	kırmızı	
G176	0,79	0,53	97,0	48,8	136	2,8	26,11	0,80	30,1	kırmızı	
G177	0,82	0,79	89,2	45,6	136	4,8	22,53	0,72	37,2	kırmızı	
G178	0,81	0,35	107,0	45,2	136	10,2	29,84	0,85	26,8	beyaz	
G179	0,81	0,59	101,0	41,3	138	11,9	29,58	0,78	31,8	kırmızı	
G180	0,78	0,48	108,8	45,7	133	8,2	21,47	0,67	33,8	kırmızı	
G181	0,80	0,51	96,6	44,0	138	2,8	24,63	0,72	28,8	kırmızı	
G182	0,80	0,35	100,6	47,1	138	4,4	29,21	0,71	26,2	kırmızı	

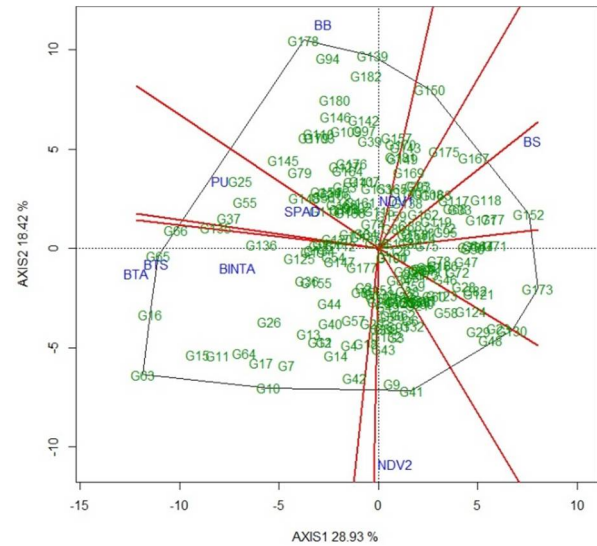
Bir popülasyonda değişim katsayısının %10 ve üzeri olması seleksiyon için yeterli bir varyasyon olduğu kabul edilmektedir [21, 4, 1]. Bu itibarla Bingöl ili yerel buğday saf hatlarında incelenen özelliklerden PU, BTS, BTA, BİNTA ve başaklanma dönemi NDVI indeksi yönünden yeterli varyasyona sahip olurken, BS, SPAD ve sapa kalkma dönemindeki NDVI değeri yönünden ise yeterli bir varyasyona sahip olmadıkları tespit edilmiştir. Normal dağılıma uygunluk bakımından özelliklerden BS ve BİNTA normal dağılıma uygunluk gösterirken diğer özellikler sapma göstermişlerdir. [1] İç Anadolu yerel ekmeçlik buğday popülasyonlarından seçilen saf hatların bitki boyu, bin tane ağırlığı, başakta tane sayısı ve başakta tane ağırlığı bakımından değişim katsayılarının %10 ve üzeri olmakla yeterli varyasyona sahip olduklarını, [4] Anadolu'nun farklı yükseltilere sahip yerlerinden topladıkları 380 adet köy yerel popülasyonlarında BS, BB ve BTS bakımından en düşük ve en yüksek değerler sırasıyla 146-164 gün, 63.8-122.3 cm, 11-63 adet olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Öte yandan [22] Anadolu'nun farklı yerlerinden toplanan popülasyonlardan seçilen 49 saf ekmeçlik buğday hatlarında BB'nin 95.75-125 cm, PU'nun 3.5-53.75 cm, BTS'nin 19.2-47.35 cm ve BTA'nın 0.70-1.86 cm olarak tespit etiketlerini bildirmişlerdir. Sun'i epidemiyoloji şartlarında genotiplerin sarı pas reaksiyonları ölçülmeye çalışılmış ancak iklim şartlarının uygun gitmemesi sebebiyle çok hassas genotipler (G44, G64, G78, G106, G108, G109, G136, G164, G166, G167) dışında okuma yapılamamıştır (Çizelge 1).

Araştırmada görsel olarak inceleme ve değerlendirmeye esas incelenen özelliklerin genotiplere göre sınıflandırılması ve genotiplerin karakterlere göre değişimi Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir. Scatter biplot yöntemi ile yapılan analizde PC1 (1. ana bileşen) % 28,93, PC2 (2. ana bileşen) % 18,42 olmak üzere toplamda varyasyonun % 47,4'ını oluşturmuştur. Özellikler arası ilişkiyi gösteren grafik Şekil 2'de, genotip karakter (GK) ilişkisini ifade eden grafik ise Şekil 3'te verilmiştir. Şekil 2'de özelliklerden BTS, BTA, BİNTA, SPAD değeri, PU ve BB vektörlerinin açısı 90 dereceden düşük, aynı yönde ve pozitif bölgede yer alırken, NDVI-2 ise çoğu özellikte negatif ilişki içerisinde yer almıştır. [23] aynı lokasyonda tescilli ekmeçlik buğday çeşitleri ile yaptıkları çalışmada NDVI değerinin SPAD değeri ile negatif ilişkide olduğunu bildirmişlerdir. BİNTA'nın diğer özelliklerle sayısal korelasyonuna bakıldığı zaman BTS (0,211**), BTA (0,455**) ve PU (0,211**) ile önemli ve pozitif ilişkiye sahip iken, BS (-0,16**) ile negatif bir ilişkiye sahip olmuştur (Çizelge 3). Genotip seçiminde gruplar dikkate alınırsa isabetli bir seçim yapılmış olur. Benzer şekilde [24] BİNTA, BTA ve BTS arasında önemli bir ilişkiden bahsetmezken, yerel buğdaylarla yapılan diğer çalışmalarda, [1] BTA ve BTS'nin aynı grupta yer aldığını, [5] BTA, BTS ve BB arasında

olumlu, BİNTA ile önemli bir ilişki tespit etmediklerini; [4] BTS ile BTA arasında pozitif, PU ve BB ile negatif ilişki olduğunu, BİNTA ile bir ilişkisinin belirlenemediğini bildirmişlerdir.



Şekil 2. Özellikler arası ilişkiyi gösteren biplot grafiği



Şekil 3. Genotip-Karakter (GK) ilişkisini gösteren biplot grafiği

Çizelge 2. Yerel ekmeçlik buğday saf hatlarında incelenen özelliklerin en düşük en yüksek, ortalama ve değişim katsayıları

Karakterler	Minimum-Maksimum	Ortalama	Normal dağılıma uygunluk test değeri	% DK
Bitki boyu (cm)	67,7-108,8	88,33	0,983	9,96
Başaklanma süresi (gün)	121-139	132,9	0,847 *	3,40
Üst boğum arası uzunluğu (cm)	0,2-14,1	4,70	0,957	59,17
Başakta tane sayısı (adet)	10,95-38,58	23,02	0,973	22,77
Başakta tane ağırlığı (g)	0,28-1,4	0,71	0,948	24,13
Bayrak yaprak klorofil içeriği (SPAD)	40,0-54,4	45,8	0,985	4,69
Bin tane ağırlığı (g)	20,03-40,42	29,38	0,988 *	12,34
NDVI (Sapa kalkma dönemi)	0,72-0,83	0,79	0,922	2,59
NDVI (Başaklanma dönemi)	0,20-0,80	0,67	0,904	17,01

*: Shapiro-Wilk testine göre normal dağılıma uygundur

Çizelge 3. Genotiplerin özellikler arasındaki korelasyonu

	NDVI-1	NDVI-2	BB	SPAD	BS	PU	BTS	BTA
NDVI-1	1							
NDVI-2	-0,047	1						
BB	0,1025	-0,4691**	1					
SPAD	-0,0922	0,0248**	0,2399	1				
BS	0,0004	-0,2997**	0,1056	-0,221**	1			
PU	-0,0123	-0,0983	0,346**	0,1232	-0,3971**	1		
BTS	-0,0429	-0,0703	0,0622	0,135	-0,2903**	0,2456**	1	
BTA	-0,0692	-0,0552	0,0488	0,136	-0,3728**	0,3238**	0,9013**	1
BİNTA	-0,0084	-0,0422	-0,0003	-0,0676	-0,1631*	0,2112**	0,2752**	0,4557**

*: 0,05, **: 0,01 seviyesinde önemlidir; NDVI: Normalize edilmiş vejetasyon indeksi, BB: Bitki boyu; SPAD: Bayrak yaprak klorofil içeriği, BS: başaklanma süresi, PU: Peduncle (üst boğum) uzunluğu, BTS: Başakta tane sayısı, BTA: Başakta tane ağırlığı, BİNTA: Bin tane ağırlığı

Hangi hat yada hatların hangi karakterler bakımından ön plana çıktığını temsil eden Şekil 3'te ise birbirleriyle olumlu ilişkide olan özellikler ile bu özellikler bakımından en yüksek değerlere sahip olan genotipler aynı bölgelerde yer almışlardır. BİNTA, BTS ve BTA; SPAD ile PU; NDVI-1 ile BB; BS ve NDV-2 olmak üzere 5 farklı grup oluşmuştur. Buna göre aynı grupta yer alan BİNTA, BTS ve BTA yönünden G65, G66, G16, G10, G15, G11, G17 ve G64 nolu genotipler incelenen özellikler yönünden uygun genotipler olarak sıralanabilir. PU ve SPAD yönünden G25, G55 ve G37 genotipleri ön plana çıkmıştır. Söz konusu bu iki özellik arasında kurağa mukavemet bakımından önemli olmayan pozitif bir ilişki olduğu [25] tarafından bildirilmiştir. [26] ise SPAD değeri ile BTS arasında pozitif önemli, BTA ile ise önemli bir ilişkisinin tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Aralarında pozitif ilişkinin olduğu NDVI-1 ve BB yönünden G178, G94, G139, G182 ve G180 genotipleri öne çıkmıştır. İslahçının amaçlarına göre değişmekle birlikte özellikle kurak bölgelerde erken dönem vejetatif aksamın toprak yüzeyini örten genotiplerin tercih edilmesi bakımından sapa kalkma dönemindeki NDVI değerinin göz önünde tutulmasını gerekli kılmaktadır. Ancak NDVI değerinin kullanılması daha ziyade verim tahmininde kullanılmakta, diğer verim unsurları ile ilişkisine ait veriler ise sayılıdır. Nitekim NDVI değeri ülkemizde olduğu gibi Swaziland, Zimbabve, Kenya, İspanya ve Kanada gibi birçok ülkede buğday verim tahmininde kullanılmaktadır [27]. Ancak genotip çevre etkileşiminin etkili olduğu NDVI değerinin diğer özelliklerle ilişkisinin belirlenmesinde farklı sonuçlar elde edilmesinden dolayı kesin bir ilişkiden bahsedilemiyor. Elde edilecek sonucun belirli çevre, iklim ve genotiplere münhasır olmasının daha isabetli olacağı söylenebilir. Dane doldurma döneminde alınan NDVI değerlerinin erken dönemde alınan değerlere göre verimi tahmin etmede doğruluk payının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [28]. Öte yandan [29], Yunanistan'da NDVI değerleri ile pamuk, pirinç ve mısırdaki %90 doğrulukla verim tahmininde bulunurken buğday da ise doğruluğun daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

4. Sonuçlar

Doğu geçit bölgesini temsil eden Bingöl ilinden toplanmış yerel ekmeklik buğday populasyonlarından saflaştırılmış saf hatların önemli verim unsurlarından BTA, BTS, BİNTA, ve PU yönünden pozitif ilişki içinde olmaları uygun genotiplerin seçimini kolaylaştırmaktadır. İslah çalışmalarında bir genotipte arzu edilen özelliklerin çok olması isabetli seleksiyon için istenen bir durum olmakla birlikte NDVI-1 yönünden G17 (%83), SPAD değeri yönünden G56 (54.4), kuraklığa mukavemetin bir göstergesi olan PU yönünden G55 (14.1 cm), BTS yönünden G16 (38.58 ad/başak), BTA yönünden G63 (1.4 gr) ve BİNTA yönünden de G26 (40.42 gr) genotiplerinin ön plana

çıktıkları görülmüştür. Bu çalışmada bazı özellikler yönünden öne çıkan genotiplerin çeşit geliştirme çalışmalarında değerlendirilmelerinin mümkün olmasıyla birlikte daha etkin ve isabetli genotiplerin tespiti için kalite parametreleri ile hastalık okumalarının da yer aldığı farklı lokasyonlarda yapılacak taramalar ile yerellerde mevcut potansiyel değerlendirilmiş olacaktır. Bu suretle yerel buğdaylarımızın mevcut özellikleri tespit edilerek melezlemelerde daha etkin istifade edilmesi sağlanabilecektir.

Referanslar

- [1] Akçura, M. ve Topal, A. İç Anadolu Bölgesi yerel ekmeklik buğday populasyonlarından seçilen saf hatların tane verimi ve kalite özellikleri yönünden bazı tescilli çeşitlerle karşılaştırılması. Ülkesel Tahıl Sempozyumu, 59-69, 2-5 Haziran 2008, Konya, 2008.
- [2] Gökçöl, M. Türkiye buğdayları. T.C. Ziraat Vekaleti Neşriyatı. Yeşilköy Tohum İslah Enst. Yayın No. 14 Ankara, 1939.
- [3] Zencirci N. ve Kün E. 1996. Variation in landraces of durum wheat (T. turgidum L. convar. durum Desf.) M.K. from Turkey. Euphytica 92: 333– 339, 1996.
- [4] Karagöz A. ve Zencirci. Variation in wheat (Triticum spp.) landraces from different altitudes of three regions of Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 775–785, 2005
- [5] Akçura M. ve Topal A. Türkiye kışlık yerel ekmeklik buğday çeşitlerinde fenotipik çeşitlilik. Bitkisel Araştırma Dergisi, 2, 8-16, 2006
- [6] Kara B. ve Akman Z. Yerel buğday ekotiplerinde özellikler arası ilişkiler ve path analizi. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(3):219-224, 2007
- [7] Akçura M. The relationships of some traits in Turkish winter bread wheat landraces Turk J Agric For 35:115-125, 2011
- [8] Karagöz A. Wheat landraces of turkey. Emirates journal of food and agriculture, 2013, 26.2: doi: 10.9755/ejfa.v26i2.16397., 2013.
- [9] Özbek Ö. Turkish wheat landraces: Population structure and function. Emirates J. Food Agric.. 26 (2): 137-148, 2014.
- [10] Sayar, M.S. Path coefficient and correlation analysis between seed yield and its affecting components in common vetch (Vicia sativa L.). Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue: 1, 596-602, 2014.

- [11] Gabriel, K.R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 58: 453-467, 1971.
- [12] Yan, W. and Tinker N.A. Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications. *Canadian Journal of Plant Science*, 86: 623–645, 2006.
- [13] Kılıç H, Aktaş H, Kendal E & Tekdal S İleri kademe ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinin biplot analiz yöntemi ile değerlendirilmesi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi* 1(2): 132-139, 2012.
- [14] Tekdal, S., Kendal, E. ve Ayana B.. İleri kademe makarnalık buğday hatlarının verim ve bazı kalite özelliklerinin Biplot analiz yöntemi ile değerlendirilmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*. 1(3): 322-330, 2014
- [15] Kendal, E. GGE biplot analysis of multi-environment yield trials in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Journal of Crop Breeding and Genetics*. 2(1):90-99, 2016
- [16] Peterson, R. F., A. B. Campbell, and A. E. Hannah. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereal. *C an. J. Res.* 26, 496-500, 1948.
- [17] Ludlow, M.M. and Muchow, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advances in Agronomy*. 43:107-153. 1990.
- [18] Hoel, B.O. Use of a hand-held chlorophyll meter in winter wheat: Evaluation of different measuring positions on the leaves. *Acta Agric. Scand., Sect. B, Soils and Plant Sci.* 48:222-228., 1998.
- [19] Yan W, Rajcan I. Biplot analysis of test sites and trait relations of soybean in Ontario. *Crop Sci* 42: 11-20, 2002
- [20] SAS Institute JMP Design of Experiments, Version 5 Copyright © 2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.2002.
- [21] Dotlacil L., Hermuth J and Stehno Z. Earliness spike productivity and protein content in European winter wheat landraces and absolute cultivars *Plant Soil Environment*, 49(2)67-74, 2003.
- [22] Hocaoğlu O. and Akcura M. Evaluating yield and yield components of pure lines selected from bread wheat landraces comparatively along with registered wheat cultivars in Çanakkale ecological conditions. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue*: 2:1528-1539, 2014.
- [23] Karaman M., Akıncı C. ve Yıldırım M. Bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde fizyolojik parametreler ile tane verimi arasındaki ilişkinin araştırılması *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 15(1): 41-46, 2014.
- [24] Ayçiçek M ve Yıldırım T. Path coefficient analysis of yield and yield components in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Pak. J. Bot.*, 38(2): 417-4 24, 2006.
- [25] Kılıç H and Yağbasanlar T). The effect of drought stress on grain yield, yield components and some quality traits of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) Cultivars. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38 (1), 164-170, 2010.
- [26] Yıldırım, M., Kılıç, H., Kendal, E. and Karahan T. The availability of chlorophyll meter reading as a single tool in durum wheat breeding *Journal of Plant Nutrition* 34(2):151–164, 2011.
- [27] Sultana S.R., Ali A., Ahmed A., Mubean M. Zia-Ul-Haq M. Ahmad S., Ercişli S. And Jaafer H.Z.E. Normalized difference vegetation index as a tool for wheat yield estimation: a case study from faisalabad, Pakistan Hindawi Publishing Corporation *Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 725326, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/725326>. 20014
- [28] Babar M. A., Reynolds M. P., Van Ginkel M., Klatt A. R., Raun W. R., and Stone M. L., Spectral reflectance to estimate genetic variation for in-season biomass, leaf chlorophyll, and canopy temperature in wheat. *Crop Science*, vol. 46, no. 3, pp. 1046–1057, 2006.
- [29] Quarmby, N.A., Milnes, M., Hindle, T.L. ve Silleons, N. The use of multitemporal NDVI meassurments from AVHRR data for crop yield estimation and prediction. Department of Geography, University of Reading, Greece, 1993.



Screening of in vitro antibacterial activities of methanol extracts of endemic *Bunium brachyactis*

Barış Enez¹, Sema Agüloğlu Fincan*², Hülya Hoşgören²

Abstract

The present study was conducted to evaluate the in vitro antibacterial properties of methanol extracts from endemic plant, *Bunium brachyactis*. The antibacterial efficacy was determined using the disk diffusion method, with 10 and 20 µl load extract volume per disc. Three test microorganisms were used namely, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Staphylococcus pyogenes* (ATCC19615). The antibacterial test results showed that the methanol extracts of *Bunium brachyactis* inhibited the growth of test microorganisms studied. Maximal antibacterial activity (19.2±1.20 mm zone of inhibition) of fruit extracts were exhibited against *S. pyogenes*. Therefore, they can be used as a natural preservative ingredient in food and/or pharmaceutical industry.

Keywords: *Bunium brachyactis*; methanol extracts; antibacterial activity

Endemik *Bunium brachyactis*'ın metanol özütlerinin antibakteriyel aktivitesinin in vitro taranması

Özet

Bu çalışma endemik *Bunium brachyactis* bitkisinden elde edilen metanol özütlerin antibakteriyel özellikleri in vitro değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Antibakteriyel etkinliği, her diske 10 ve 20 µl özüt yüklenerek disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. 3 Test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Staphylococcus pyogenes* (ATCC19615) kullanıldı. Antibakteriyel test sonuçları, *B. Brachyactis*'ın metanol özütleri çalışılan test mikroorganizmalarının büyümesini inhibe ettiğini gösterdi. Meyve özütleri maksimum antibakteriyel aktivitesini (19.2±1.20 mm inhibisyon zonu), *S. pyogenes*'e karşı gösterdi. Sonuç olarak ilaç veya gıda endüstrisinde doğal koruyucu bileşeni olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bunium brachyactis*; metanol özütleri; antibakteriyel aktivite

1. Introduction

Recently, the various extracts of plants have provoked interest as sources of natural products. They have been screened for their potential uses as alternative remedies for the treatment of many infectious diseases and the preservation of foods from the toxic effects [1]. It is estimated that an amount of 20,000 species from several families are useful for these purposes [2]. Furthermore, about 80% of the world population is dependent (wholly or partially) on plant-based drugs [3]. Scientific experiments on the antimicrobial properties of plant components were first documented in the late 19th century [4]. The shortcomings of the drugs available today propel the discovery of new pharmacotherapeutic agents in medicinal plants [5]. In recent years, multiple drug/chemical resistance in both

human and plant pathogenic microorganisms have been developed due to indiscriminate use of commercial antimicrobial drugs/chemicals commonly used in the treatment of infectious diseases [6]. On the other hand, foodborne diseases are still a major problem in the World, even in well-developed countries, like USA [7].

Food spoilage or deterioration is predominantly caused by the growth of microorganisms. Many pathogenic bacteria, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus pyogenes*. For example *S. aureus* is an extracellular, pyrogenic pathogen that can cause localised infections or life threatening systemic diseases through its ability to destroy tissue and protect bacteria from the host immune response [6]. Therefore, they are intensely screened and applied in the fields of pharmacology, pharmaceutical botany, medical and clinical microbiology, phytopathology and food preservation [8].

Bunium is a genus of flowering plants in the Apiaceae, with 45 to 50 species. The genus *Bunium* is in the family

¹ Bingöl University, Technical Sciences Vocational School, Department of Veterinary, 12000 Bingöl, Turkey

² Dicle University, Faculty of Science, Department of Biology, 21280 Diyarbakır, Turkey

*Corresponding author E-mail: semaguloglu@hotmail.com

Apiaceae in the major group *Angiosperms* (Flowering plants). *Bunium brachyactis* is glabrous perennial with slender branched procumbent or ascending terete finely ridged stems up to 15 cm. Basal leaves ovate, 1-2 pinnate, 5-8×2,5-3,5cm; ultimate segments ovate with oblong-spathulate rounded lobes, 7-17×10 mm. Upper cauline leaves few with linear lobes. Rays 4-8, equal, 3-10 mm. Bracts 3-6, 2-7×0.5-1 mm. Bracteoles 3-6, 2-3,5×0.5 mm. Flowers White, 8-15 per umbellule. Fruits oblong, glabrous, 3×1,5 mm; styles 2-3mm; stylopodium flat.

To the best of our knowledge, no antibacterial works have been previously reported on *Bunium brachyactis*. In this work, we report the antibacterial activities of methanol extracts from *Bunium brachyactis*.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The herbal parts of *Bunium brachyactis* was collected from the Ziyaret Mountain, Diyarbakır-Turkey when flowering in June 2012 and identified by Ömer SAYA.

2.2. Preparation of the methanolic extracts

Dried all parts of the plant at room temperature were ground to a fine powder with a grinder. Then the powdered plant material (10 g) was extracted using a extractor with 100 ml methanol (MeOH) at 37 °C for 48 h. There after, the extract was filtered and evaporated to dryness under vacuum at 40 °C with a rotary evaporator.

2.3. Microorganism strains

The following bacteria were tested: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and

Staphylococcus pyogenes ATCC19615. The organisms tested were obtained from the culture collections of the Research Hospital of Dicle University and Microbiology Research Laboratory, Department of Biology, Diyarbakir, Turkey. Bacterial strains were cultured overnight at 37 °C in nutrient broth (NB).

2.4. Disc diffusion method of methanol extracts

The disc diffusion method was applied for the determination of antibacterial activities of the methanol extracts. Then geometric dilutions ranging from 100 µg/ml to 10 mg/ml of the extracts were prepared. A suspension of the tested microorganism (0.1 ml of 10⁸ CFU/ ml) was spread over the surface of agar plates (NA). Sterile filter paper discs (6 mm diameter) were impregnated with 10 µl and 20 µl of the extracts and placed on the inoculated plates. Before incubation, all petri dishes were kept in the refrigerator (4°C) for 2 h. Then they were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria. All tests were performed under sterile conditions in triplicate.

3. Results and discussion

Results of the antibacterial screening of methanol extracts of *B.brachyactis* revealed antibacterial activity against all tested bacterial strains at different concentrations. The obtained inhibition varied from 7.00 to 19.2±1.20 mm with inhibition zone recorded with test microorganisms but maximal antibacterial activity (19.2±1.20 mm zone of inhibition) of fruit extracts were exhibited against *S. pyogenes* at concentration of 10 mg/ml (Table 1). The results indicated that the tested bacteria were sensitive to the methanolic extracts of *B. brachyactis* (Tables 1–5).

Table 1. Antibacterial activity of the methanol extracts of *B.brachyactis* fruits

Test bacteria	100 µg/ml		1 mg/ml		3 mg/ml		6 mg/ml		10 mg/ml	
	10 µl	20µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
<i>S. aureus</i>	ND	10.0±1.00	9.2 ±0.32	12.0±1.00	10.4±1.15	13.2±0.69	10.5±1.56	13.6±1.24	10.8±1.84	13.9±1.32
<i>S. pyogenes</i>	8.2±0.44	10.2±1.52	9.0±1.00	11.0±1.00	12.0±1.00	13.3±0.52	14.2±1.25	17.2±1.07	16.0±1.00	19.2±1.20
<i>E. coli</i>	ND	9.0±1.00	8.0±1.00	10.0±1.00	8.4±1.32	10.6±1.24	8.8 ±1.76	11.0±1.00	8.0 ±2.00	11.6±1.58

DD, agar disk diffusion method. Diameter of inhibition zone (mm±SD).
 ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Table 2. Antibacterial activity of the methanol extracts of *B.brachyactis* tubers

Test bacteria	100 µg/ml		1 mg/ml		3 mg/ml		6 mg/ml		10 mg/ml	
	10 µl	20µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
<i>S. aureus</i>	ND	10.2 ±1.52	ND	10.2±1.52	8.4±1.42	10.4±1.56	8.5±0.64	10.8±1.50	9.0±1.00	11.6±1.58
<i>S. pyogenes</i>	ND	11.2±0.24	ND	11.6±1.58	8.0±1.78	11.6±1.58	10.0±1.00	12.0±1.00	10.4±1.56	13.3±0.52
<i>E. coli</i>	ND	9.0±1.00	ND	10.0 ± 1.00	ND	10.0±1.00	ND	10.0±1.00	ND	10.2±1.52

DD, agar disk diffusion method. Diameter of inhibition zone (mm±SD).
 ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Table 3. Antibacterial activity of the methanol extracts of *B.brachyactis* leaves

Test bacteria	100 µg/ml		1 mg/ml		3 mg/ml		6 mg/ml		10 mg/ml	
	10 µl	20µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
<i>S. aureus</i>	ND	10.0±1.00	ND	11.0±1.00	ND	11.2±0.24	8.4±1.42	11.6±1.58	9.0±1.00	12.0±1.00
<i>S. pyogenes</i>	ND	11.0±1.00	8.2±0.44	12.2±1.14	10.0±1.00	15.4± 1.56	10.4±1.56	15.6±2.24	11.0±1.00	16.2±2.32
<i>E. coli</i>	ND	10.0±1.00	8.0±1.00	10.0±1.00	8.2±1.16	10.0±100	8.2±1.16	10.4±1.56	8.4±1.42	10.8±1.76

DD, agar disk diffusion method. Diameter of inhibition zone (mm±SD).
 ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Table 4. Antibacterial activity of the methanol extracts of *B. brachyactis* stems

Test bacteria	100 µg/ml		1 mg/ml		3 mg/ml		6 mg/ml		10 mg/ml	
	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
<i>S. aureus</i>	ND	10.2±0.54	7.0±1.00	10.6±1.00	7.2±1.14	11.2±1.52	8.0±1.00	11.6±1.52	9.2±1.68	12.0±1.00
<i>S. pyogenes</i>	ND	10.0±1.00	8.4±1.42	12.0±1.00	8.6±1.56	14.0±1.00	12.2±1.32	15.0±1.00	13.0±1.00	16.0±1.00
<i>E. coli</i>	ND	9.0±1.00	7.2±1.15	10.2±0.54	8.0±1.00	10.2±0.54	8.0±1.00	10.2±0.54	8.0±1.00	10.2±0.54

DD, agar disk diffusion method. Diameter of inhibition zone (mm±SD).

ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Health related problems increased due to world population increase, instability in nutrition and continuous development of industrial areas. Today, despite of the serious developments in science and technology, unconscious consumption of natural resources and faced economical difficulties, obliged the multi-purpose usage of the natural resources. On the other hand, microorganisms gaining resistance against the natural and synthetic antibiotics used in struggle with infectious diseases and disabling them and the fact that those antibiotics have adverse effects persuaded the medical science to the nature in pursuit for new antimicrobial materials. Therefore the studies made on plants and herbal medicine raw materials obtained from them gained importance. Accordingly the consumption of natural drugs obtained from plants seriously increased in treatment of various diseases [9].

In our study, the antibacterial effect of *Bunium* plant against *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes* by performing methanol extraction from its fruits, leaves, root bulb, stem and flowers was researched by disk diffusion method. In the research made it was determined that the antibacterial effect increases in line with the increasing concentration. In a study performed by Sökmen et al. (2004), it was stated that antibacterial effect increase due to dosage increase in *T. spathulifolius* extract dosage while Loziene et al. (2006) stated that antibacterial effect increase due to dosage increase in *T. pulegioides* extract dosage [10,11].

While it was determined that *B. brachyactis* extracts used in the study effected most on *S. pyogenes* among microorganisms and caused inhibition, it was observed that *S. aureus* was mildly effected and effect on *E. coli* was minimum. The results obtained in other studies are in accordance with the results obtained in our study. Holetz et al. (2002) determined that 10 plant extracts among Brasil medical plants have various levels of antibacterial activity. They determined that development of *S. aureus* was significantly prevented while the other standard species (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) were not effected [12].

Yiğit et al. (2009) determined the antimicrobial activity of water and methanol extracts of walnut plant leaves and shells collected from Erzincan (Kemah) region on *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* [9].

Falleh et al. (2008) stated that the methanol extracts of *Cynara cardunculus* L. plant leaves are effective on *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* and *M. luteus* [13].

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study concerning the antibacterial activity of methanol extracts from *B. Brachyactis*. Disc diffusion method is used to assess the presence of antimicrobial activities in methanol extracts of different parts of plant. These herb demonstrated antibacterial effects in vitro, against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus pyogenes*. The present investigation provides important baseline information for the use of *B. brachyactis* as well as its constituents for the treatment of infections associated with the studied microorganisms

References

- [1] Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M., Somken A., Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl), *Food Chem*, 84 519–525, 2004.
- [2] World Health Organisation WHO, Guideline for the Assessment of herbal medicines. WHO Expert Committee on specification for pharmaceutical preparation. Technical Report series no, 863,8, 1996.
- [3] Zaika L.L., Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination, *J Food Safety*, 9, 97–118, 1975.
- [4] Kuete V., Ngameni B., Fotso Simo C.C., Kengap Tankeu R., Tchaleu Ngadjui B., Meyer J.J.M., Lall N., Kuate J.R., Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *J Ethnopharmacol.*, 120, 17–24, 2008
- [5] Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H., Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp., *Food Chem.*, 103, 1449–1456, 2007.
- [6] Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Breese J.S, Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe RV., Food related illness and dead in the United States, *Emerging Infect Diseases*, 5, 607–625, 1999.
- [7] Lowy F.D., Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiology* 8, 341–343, 2000
- [8] Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G., GC–MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*, *J Agric and Food Chem*. 48, 2576–258, 2000.
- [9] Yiğit D., Yiğit N., Aktaş E., Özgen U., Juglans Regia L of antimicrobial activity. *Journal of Turkish Society of Microbiol*, 39, 7–11, 2009.
- [10] Sökmen A., Güllüce M., Aşkın Akbulut H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sökmen M., Şahin F., The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*, *Food Control*. 15, 627–634, 2004.
- [11] Loziene K., Venskutonis P.R., Sipailiene A., Labokas J., Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. Chemotypes, *Food Chem*, 103, 546–559, 2007.
- [12] Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D.A, Nakamura C.V, Filho B.P., Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment

of Infectious Diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97, 1027–1031, 2002.

- [13] Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N, Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities Comptes Rendus Biologies, 331, 372–37, 2008.



Assessment of shear walls effectiveness in controlling lateral drift for 10 stories reinforced concrete building

Mehrzaad Mohabbi Yadollahi¹, Ahmet Benli*¹

Abstract

Shear wall is a structural element used to resist horizontal forces parallel to the plane of the wall. Shear wall has highly in plane stiffness and strength which can be used to simultaneously resist large horizontal loads and support gravity loads. They are specially designed structural walls include in the buildings to resist horizontal forces that are induces in the plane of the wall due to wind, earthquake and other forces. They are mainly flexural members and usually provided in high rise buildings to avoid the total collapse of the high rise buildings under seismic forces. In this study, study of 10 stories building is presented. Story shear and displacement is obtained by using standard package ETABS.

Keywords: Shear wall; lateral loading; medium-rise RC building; lateral displacement

On katlı betonarme bir binanın yatay deplasman kontrolünde perde duvarların etkinliğinin değerlendirilmesi

Özet

Perde duvar, duvar düzlemine paralel yatay kuvvetlere mukavemet göstermek için kullanılan bir yapı elemanıdır. Perde duvar büyük yatay yüklere karşı mukavemet göstermek ve düşey yükleri desteklemek için kullanılan son derece yüksek düzlem sertliği ve mukavemete sahiptirler. Perde duvarlar özellikle rüzgâr, deprem ve diğer kuvvetlerden dolayı duvar düzlemini etkileyen yatay kuvvetlere mukavemet göstermek için tasarlanmış taşıyıcı duvarlardır. Onlar esas olarak eğilme elemanlardır ve genellikle deprem kuvvetlerinin altında yüksek katlı binaların toplam çöküşünü önlemek için yüksek katlı binalara yerleştirilir. Bu çalışmada, 10 katlı bir binanın çalışması sunulmuştur. Kat kesme kuvvetleri ve deplasmanlar ETABS programı kullanılarak elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Perde duvar; yanal yükleme; orta katlı betonarme bina; yanal deplasman

1. Introduction

To have the lateral story drift within the code-specified limits is one of the major requirements in the seismic design of multi-story Reinforced Concrete (RC) buildings. Generally under seismic forces of moderate to high magnitude, these requirements are difficult to satisfy unless a sufficient quantity of shear wall is provided in the building. Shear walls improve the lateral stiffness of the building and thus control the story drift of the building substantially. As a result, almost all the seismic codes recommend the employment of shear walls for the design of RC buildings against seismic force[1-5].The total and relative sway are very important factors in assessing the seismic performance of a reinforced concrete structure. Observations of four major earthquakes in Turkey from 1992 to 1999 have indicated that uncontrolled sway is a significant contributor to collapse due to the occurrence of uncontrolled second order moments. Being in full

appreciation of the importance of storey drift, particularly during a seismic attack, building codes (UBC, ACI and others) require the calculation of seismic drift and impose restrictions on its maximum or relative values [6-9].

Shear walls are the structural system used to increase the strength of RC buildings. In high rise buildings, the shear walls are used to resist lateral loads that may be caused by wind and seismic motion. RC shear wall provide large strength and stiffness to the building in the direction of their orientation which considerably reduces lateral sway of the building and there by reduces damage to the structure[10, 11]. If a high rise RC building is designed without shear wall the beam and column sizes are large and so many problems arises at the joints and due to this it is difficult to place and vibrate the concrete at such places and displacement is more which in turn induces heavy forces on the structure therefore shear wall become essential from the point of view of economy. By providing shear wall, the structure become safe and durable and also more stable the function of shear wall is to increase rigidity for wind and seismic load resistance. The use of shear wall gains more

¹ Bingöl University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Civil Engineering, 12000 Bingöl, Turkey

*Corresponding author E-mail: abenli@bingol.edu.tr

popularity in the construction of service apartments or office. In this paper, the main aim is to study the optimum location and its effectiveness of shear wall in irregular high rise RC building [2, 12-14].

2. Problem statement

Due to the seismic vulnerability and importance of life and structures, detailed analysis and design of shear walls is necessary. Shear walls have been in use for medium to high rise structures but generally the design is too conservative. This not only affects the economy but also the structural behavior under cyclic loads. Using thicker cross section induces large base shear forces, minimizes ductility and reduced time period of structure [14, 15].

3. Materials and method

A ten-story RC building containing shear walls was selected for the present study. The building is rectangular in plan having a total height of 30 m with 3-bays in each direction and a constant floor plan area of 162 m² at each story. The height of every story is equal to 3 m. The building is assumed to be fixed at the base. The floors of the building are considered to act as rigid diaphragms. The dimensions of columns, beams were given in Table 1.

3.1. Modeling of the building

The building is modelled in ETABS with the assumptions given below (Fig. 1-3):

- ❖ Damping of structure: %5
- ❖ Floors are modelled as rigid elements.
- ❖ Walls are modelled as shell elements.
- ❖ Beam column joints are taken as rigid joints.
- ❖ All supports are modelled as fixed supports.
- ❖ The system was assumed to be linearly elastic.
- ❖ For mass source 100 % D.L and 30% L.L is used. The mass is lumped at each story level [14].

3.2. Method

Elastic analysis should be based on the assumption that the stress-strain behavior of the material is linear. As a consequence, to perform a global elastic analysis, the stresses applied in any cross section of any member, must be lower than the yield strength of the material.

Type of frame: Reinforced Concrete (RC) moment resisting frame fixed at the base and reinforced concrete (RC) moment resisting frame fixed at the base with shear wall

- ❖ Seismic zone: 1 (A0=0.40)
- ❖ Number of story: 10
- ❖ Floor height: 3.0 m
- ❖ Depth of Slab: 10 cm
- ❖ Size of beam and column as shown in Table 1:

Table 1. Size of beams and columns

Story	Size of Beam(cm)	Size of Column(cm)
Story1- Story3	C45*45	B50*45
Story4- Story6	C40*40	B45*45
Story7- Story10	C35*35	B45*40

- ❖ Spacing between frames shown in Figure 1
- ❖ Live load on floors: 200 kgf/m²
- ❖ Live load on tenth floor roof: 150 kgf/m²
- ❖ Dead load on floors: 380 kgf/m²
- ❖ Dead load on tenth floor roof: 350 kgf/m²
- ❖ Wall load on external edges: 800 kgf /m
- ❖ Wall load on tenth floor roof on external edges: 240 kgf /m
- ❖ Materials: concrete 230kg/cm², Rebar yield stress 4200 kg/cm² steel material
- ❖ Thickness of shear wall as shown in Table 2

Table 2. Thickness of shear Wall

Story	Thickness of shear wall (cm)
Story1- Story3	15
Story4- Story6	12
Story7- Story10	10

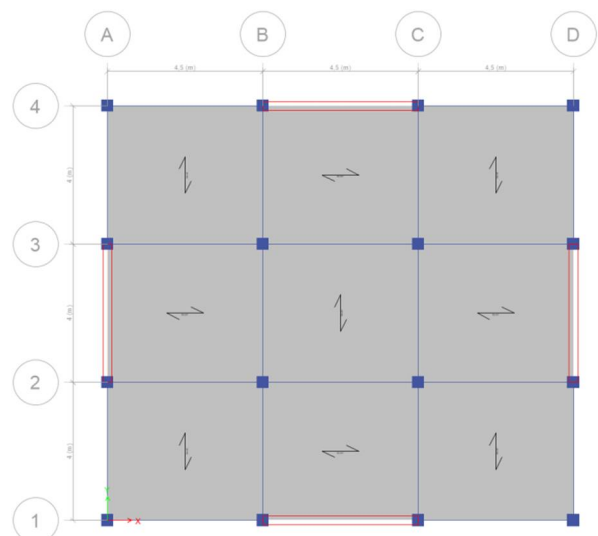


Figure 1. Plan of structures

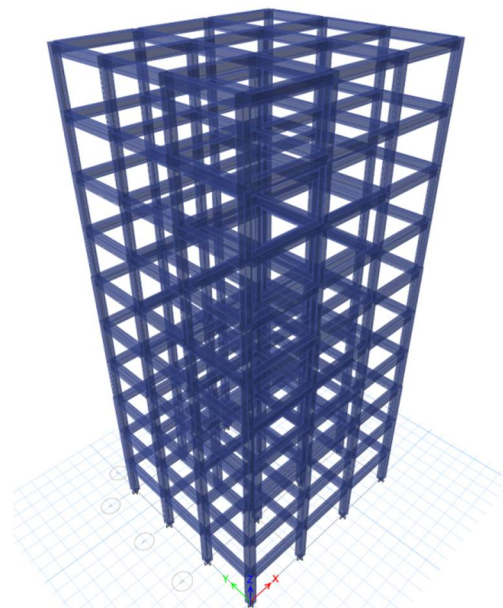


Figure 2. Case 1: Rigid frame

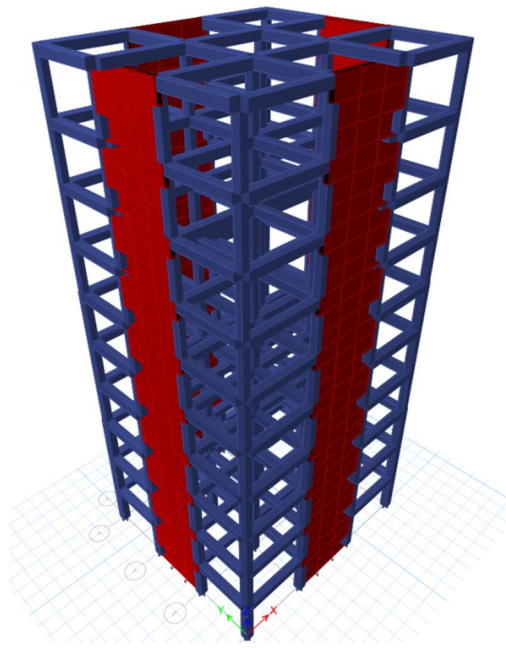


Figure 3. Case 2: Rigid frame with shear wall building

4. Analysis results

In the present study, the building mentioned above was laterally stiffened with the shear wall and with no shear wall. The building was subjected to seismic forces, and the influence of shear wall in controlling the lateral response of the building was then studied.

Case 1: Without shear wall: Case 1 is analyzed using frame structure only by removing shear walls. This is important because it will dictate the effectiveness of shear wall in controlling lateral drift in structure.

Case 2: Rigid frame with shear wall Building: Analysis is done with shear wall situated at external edges in 15 cm, 12 cm and 10 cm thickness (Figure 3 and Table 2).

Table 3. Lateral displacement along X-direction

Story Number	Story displacement in x direction in rigid frame system(m)	Story displacement in x direction in rigid frame with shear wall system(m)
0	0	0
1	0.003217	0.000886
2	0.007791	0.002578
3	0.012467	0.004815
4	0.018422	0.007676
5	0.024408	0.010876
6	0.029914	0.014219
7	0.036143	0.017758
8	0.041469	0.021223
9	0.045542	0.024559
10	0.048183	0.027658

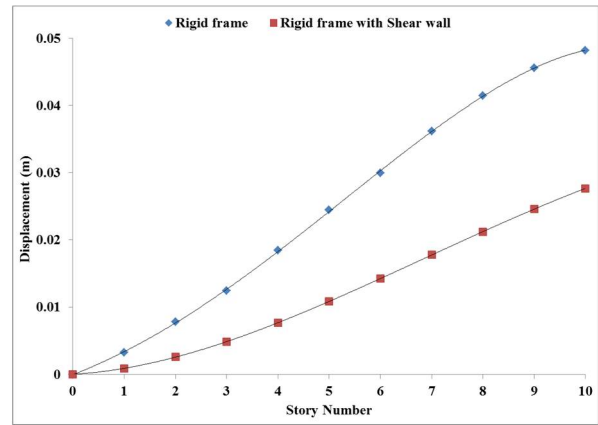


Figure 4. Lateral displacement along X-direction

Table 4. Lateral displacement along Y-direction

Story Number	Story displacement in y direction in rigid frame system(m)	Story displacement in y direction in rigid frame with shear wall system(m)
0	0	0
1	0.003138	0.000965
2	0.007539	0.002794
3	0.012045	0.005192
4	0.017840	0.008258
5	0.023671	0.011662
6	0.029058	0.015189
7	0.035223	0.018916
8	0.040525	0.022532
9	0.044628	0.025980
10	0.047354	0.029150

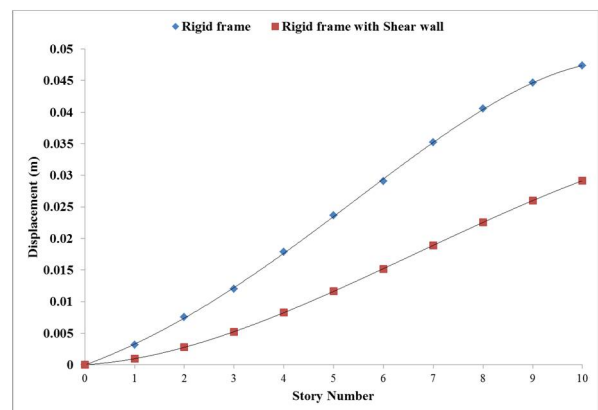


Figure 5. Lateral displacement along Y-direction

5. Result and discussion

The both structural models-one RC building without shear walls and second RC building with shear walls are analysed by computer program ETABS. Response analyses are made both for the x-direction and y-direction. The results are briefly summarized below:

The lateral forces produce critical stresses in the structure, inducing undesirable stresses in the structure,

induce undesirable vibrations or cause excessive lateral sway of the structure with the result causing damage.

6. Conclusion

1. It is clear that shear wall frame interaction systems are very effective in resisting lateral forces induced by earthquake
2. Since shear walls are quite effective in providing resistance and stiffness against the horizontal loading induced by earthquake motions, therefore, RC shear wall application is the most preferred method in the strengthening process of the RC buildings constructed in earthquake prone regions.
3. Analysing the behaviour of shear walls in earthquakes, it was concluded to provide shear walls in such a configuration so as to resist strong ground motions in an effective and efficient way.
4. The presence of shear wall can affect the seismic behavior of frame structure to large extent, and the shear Wall increases the strength and stiffness of the structure. It has been shown that the model 2 i.e.rigid frame with shear wall system has lower lateral displacement in x and y direction.
5. Structure with shear wall is suitable for the effect of wind load and earthquake load on the performance of building.

References

- [1] Dahesh, M.A., A. Tuken, and N.A. Siddiqui, Controlling the earthquake-induced lateral displacement of RC buildings using shear walls: parametric study. *Arabian Journal of Geosciences*, 2015. 8(11): p. 9913-9927.
- [2] Chaallal, O., L. Guizani, and P. Malenfant, Drift-based methodology for seismic proportioning of coupled shear walls. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 1996. 23(5): p. 1030-1040.
- [3] Essiz, O. and I. Mert, Shear wall concrete structures behaviour in seismic region. *Itu-lahs International Conference on Kocaeli Earthquake - 17 August 1999*, 1999: p. 341-349.
- [4] Fan, C.L. and S.Y. Zhang, Rigid-Plastic Seismic Design of Reinforced Concrete Shear Wall. *Engineering Plasticity and Its Applications: From Nanoscale to Macroscale*, 2009: p. 368-374.
- [5] Kim, T.W., D.A. Foutch, and J.M. LaFave, A practical model for seismic analysis of reinforced concrete shear wall buildings. *Journal of Earthquake Engineering*, 2005. 9(3): p. 393-417.
- [6] Tuken, A. and N.A. Siddiqui, SBC-based assessment of shear wall quantity in moment resisting frame buildings. *Ksce Journal of Civil Engineering*, 2015. 19(1): p. 188-199.
- [7] Tuken, A. and N.A. Siddiqui, Assessment of Shear Wall Quantity in Seismic-Resistant Design of Reinforced Concrete Buildings. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2013. 38(10): p. 2639-2648.
- [8] Tuken, A., Analysis and assessment of seismic drift of reinforced concrete mixed (shear wall - frame) structures. *Technology*, 2004. 7(4): p. 523-532.
- [9] Zhu, T.J., Seismic Story Drift Estimation. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 1994. 21(6): p. 1081-1083.
- [10] Lee, T.H. and K.M. Mosalam, Sensitivity of seismic demand of a reinforced concrete shear-wall building. *Applications of Statistics and Probability in Civil Engineering*, Vols 1 and 2, 2003: p. 1511-1518.
- [11] Heerema, P., M. Shedid, and W. El-Dakhkhni, Seismic Response Analysis of a Reinforced Concrete Block Shear Wall Asymmetric Building. *Journal of Structural Engineering*, 2015. 141(7).
- [12] Suresh, M.R. and A.S. Yadav, The Optimum Location of Shear Wall in High Rise R.C Buildings Under Lateral Loading. *JRET:International Journal of Research in Engineering and Technology* 2015. 4 (6): p. 184-190.
- [13] Truman, K.Z., et al., Comparison of linear and nonlinear seismic drift histories for midrise steel frames. *Engineering Structures*, 1996. 18(8): p. 577-588.
- [14] Ali, J., et al., A comparative Study to Analyze the Effectiveness of Shear Walls in Controlling Lateral Drift for Medium to High Rise Structures (10 – 25 Storeys), in *2nd International Conference on Geological and Civil Engineering IPCBEE*. 2015, IACSIT Press: Singapore. p. 31-36.
- [15] Oviedo-Amezquita, J.A., M. Midorikawa, and T. Asari, Seismic Performance of Story Drift-Controlled RC Frames with Hysteretic Dampers. *Earthquake Spectra*, 2012. 28(4): p. 1569-1587.



Türk Doğa ve Fen Dergisi Turkish Journal of Nature and Science

<http://www.bingol.edu.tr/dergiler/turk-doga-ve-fen-dergisi.aspx>



İşlenmiş ve işlenmemiş tarımsal toprakların karbon stoklarının karşılaştırılması: Bir Nusaybin örneği

İlhan Zan¹, Erdal Sakin*¹

Özet

Global karbon döngüsünde, karbon stokları ve dengesi gelecek yüzyılın en önemli konulardan biri olacaktır. Bu çalışma Mardin ili Nusaybin ilçesinde bulunan işlenmiş ve işlenmemiş alanlarında organik ve inorganik karbon miktarları ile stokları hesaplamak ve karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışma alanı toplamda 148 000 m² olup, bunun 30 000 m² mera, 78 000 m² işlenmemiş ve 40 000 m² işlenmiş alanlardan oluşmaktadır. Organik karbon miktarları; İşlenmiş topraklar 8,07-8,25, işlenmemiş toprakları 17,09-22,72, mera alanları ise 7,64-9,21-10,38 kg C m⁻² arasında değişmektedir. İnorganik karbon miktarları sırasıyla 60,83-64,23, 40,12-44,90 ve 17,90-18,72 kg C m⁻² arasındadır. Organik karbon stokları sırasıyla 0,32-0,33, 1,33-1,77 ve 0,23-0,28 Gg (1 Gg=10⁹g) arasında iken inorganik karbon stokları 2,43-2,57, 3,12-3,5 ve 0,54-0,56 Gg arasında saptanmıştır. Çalışma bölgesinde mera alanları ile tarımsal faaliyetlerin düzenli olarak yapıldığı alanlar karşılaştırıldığında, işlenmiş alanlarda organik maddenin yaklaşık % 51,92 oranında kaybolduğu ortaya çıkmıştır. Mayınlardan arındırılmış alanlar ile işlenmiş alanlar karşılaştırıldığında ise organik maddenin %57,74' si kaybolmuştur. Bu kayıplara aşırı sürüm, hasattan sonra alanda kalan bitki artıklarının otlatma ile tüketilmesi ve anızın yakılmasının sebep olduğu düşünülmüştür. Bölgenin kurak ve yarı kurak olması ve yağışın yetersiz olmasına rağmen bölge topraklarının karbon stokları ve miktarlarının beklenenden fazla çıkmıştır. Bu fazlalık toprakların yüksek kil ve kireç içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Organik karbon; inorganik karbon; karbon stokları

Comparing of carbon stocks the agricultural soils of cultivated and uncultivated: A case study of Nusaybin

Abstract

In global carbon cycle, carbon stocks and balance will be very important topics in the future century. An objective of this study was to establish and comparing the organic and inorganic carbon amounts with stocks in the cultivated and uncultivated lands of Nusaybin district in Mardin town. This areas is occupys about 148 00 m² which is 30 000 m² pasture, 78 000 m² uncultivated and 40 000 m² cultivated. Organic carbon amounts is changed in 8.07-8.25 of cultivated, 17.09-22.72 of uncultivated and 7.64-9.21-10.38 kg C m⁻² of pasture. Inorganic carbon amounts is between 60.83-64.23, 40.12-44.90 and 17.90-18.72 kg C m⁻² respectively. Organic carbon stocks found between 0.32-0.33, 1.33-1.77 ve 0.23-0.28 Gg (1 Gg=10⁹g) while inorganic carbon stocks were 2.43-2.57, 3.12-3.5 and 0.54-0.56 Gg, respectively. Cultivation has caused about, losses of organic carbon from the soil when comparing pasture and cultivated soils 51.92% and 57.74% of uncultivated and cultivated. This is likely due to intensive cultivation, burning of the residue or removal to feed animals. Carbon amounts and stocks which is somewhat higher than expected, in spite of arid and semi-arid regions at the studies area. High contents of clay and carbonates likely reduce the rate of oxidation and therefore, increase the rate of organic carbon amounts and stocks. Soil thickness in the plains is also unexpectedly high, supporting the view that the soils are organic carbon amounts and stocks.

Keywords: Organic carbon; inorganic carbon; carbon stocks

1. Giriş

Toprak organik karbon stokları, global karbon döngüsünde önemli rol oynar ve yeryüzünde bulunan karbon stoklarının en geniş ve önemlisidir. Tarım toprakları genel olarak doğal alanlardaki topraklardan daha az organik

karbon içerdiği bilinmektedir. Bunun esas nedenleri, organik karbonun toprak işlemesi ile daha hızlı parçalanması ve toprak erozyonu ile üst toprağın taşınması ve toprağa karbon girişinin azalması [1,2] ve diğer faktörlerin etkisiyle oluşan kayıplar olduğu belirtilmektedir. Arazi kullanımlarındaki değişimler özellikle yoğun agroekosistemler atmosfere 1,7 Pg C salmaktadır [3]. Uygun toprak yönetim pratikleriyle özellikle tarım yapılan alanlarda karbon içeriğinin artırılabilceği araştırmalarla kanıtlanmıştır [4]. Paustian ve

¹ Tarım Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı, Nusaybin İlçe Müdürlüğü, Mardin, Türkiye

² Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Osmanbey Kampüsü, Şanlıurfa, Türkiye

*Sorumlu yazar E-mail: esakin@harran.edu.tr

ark. [5], tarım topraklarının karbon stoklama kapasitesi göz önüne alındığında artan atmosferik karbonun azaltılmasında önemli bir araç olduğu ve böylece yıllık 0,4–0,9 Pg C depolanabileceği belirtmiştir.

Kurak ve yarı – kurak iklim bölgelerinde yüksek sıcaklık ve fazla oksidasyondan dolayı toprak organik karbonun (TOK) birikme oranı yüksek ayrışma ve parçalanma nedeniyle düşüktür. Bu bölgelerde sulama koşulları altında TOK'un birikmesinin zor olması sebebiyle karbonun inorganik formda bağlanması kurak ve yarı kurak bölgelerde alternatif olabileceği düşünülmektedir. Ancak toprak inorganik karbon (TİK) stokları ile ilgili olarak hala açıklanamayan pek çok problem ve bilgi yetersizliğinden dolayı da global karbon döngüsündeki yeri, önemi ve ölçümü göz önüne bulundurulmamaktadır. Bu tür bölgelerde karbon en fazla TİK formunda bulunmaktadır [6].

Global karbon döngüsü geçen 20 yıl içinde tüm bilim dalları (biyoloji, jeoloji, okyanus, toprak bilimi vs) için önemli bir konu olmuştur [7]. Bu önem atmosferik karbondioksit konsantrasyonunun uzun dönem ölçüm kayıtlarına göre endüstriyel devriminden bu yana %30 oranında artmasından kaynaklanmaktadır. Arazi kullanım yönetimindeki değişikliklerin etkisi %25 olmasına rağmen, artışın büyük bölümü fosil yakıtlardan kaynaklandığı ileriye sürülmektedir [8,9]. Sakin [10], verilerine göre tarım tekniklerinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi topraklarının karbon stoklarının üzerinde etkili olduğu belirtmiştir. Çalışmalarına göre arazi kullanım sonucu stokların yaklaşık %58'inin kaybolduğu belirtmiştir. Başta gelişmiş ülkeler olmak üzere dünyada bu konuya büyük bir önem verilmektedir. Tarım topraklarında giderek organik maddenin azaldığı ve bundan dolayı tarım amenajman tekniklerinin gözden geçirilmesine büyük ihtiyaç olduğu belirtilmektedir.

Topraklar karasal karbon stoklarının en büyüğü olup, karasal karbon miktarı vejetasyonun 3, atmosferin 2 katı kadardır. Topraklar (1 m derinliğinde) 1 500 Pg C [11], 1 580 Pg C [12] ve 2 m derinliğinde 2 500 Pg C [13] stokuna sahip olduğu belirtilmektedir. Vejetasyonda 650 Pg C [14], 610 Pg C [12] ve atmosfer 750 Pg C [14], 800 Pg C [12] karbon içerdiği ifade edilmektedir. Janzen [15], yapmış olduğu çalışmada 1 m derinliğin altında daha çok karbonun inorganik formda bulunduğunu belirtmiştir.

Bu çalışmanın amacı, Mardin ilinin Nusaybin ilçesinde bulunan işlenmiş ve işlenmemiş (mera ve mayınlı) tarımsal toprakların karbon stoklarının belirlenmesi ve bunların karşılaştırılmasıdır.

2. Materyal ve metot

2.1. Materyal

Bu çalışmada Nusaybin ilçesinin 3 km kuzeydoğusunda yer alan Beylik köyünde bulunan mera alanlarında ve geleneksel tarımın yapıldığı alanlar ile Nusaybin- Suriye arasında bulunan ve mayınlardan temizlenmiş alanlardan ikişer olmak üzere toplam 6 profil genetik horizonlar (100 cm derinlikte) bazında açılarak farklı derinliklerden bozulmuş ve bozulmamış toprak örnekleri alınmıştır (Şekil 1). Alınan örneklerde bazı fiziksel ve kimyasal analizlerin yanında çalışmanın ana konusunu oluşturan toprakların karbon miktarları belirlenmiştir.

Nusaybin'in yıllık ortalama sıcaklığı 18,9°C'dir. Yaz ve kış mevsimleri arasındaki ortalama sıcaklık farkının yüksek olması bu bölgede iklimin karasallığını ortaya koyması bakımından oldukça önemlidir. Yaz mevsiminde ortalama sıcaklık 31°C, kış mevsiminde ise 7,2°C'dir. Özellikle yaz aylarında yüksek sıcaklık ortalamalarının 30°C ve daha fazla olduğu gün sayısı Nisan ayından başlayıp Kasım ayının başına kadar devam etmektedir. Nusaybin'de yıllık ortalama yağış 470,2 mm'dir. Yağışın mevsimlere dağılımına bakıldığında en fazla yağışın kış mevsimine düştüğü görülmektedir (%51,8). Kış mevsimini ilkbahar (%34,9), sonbahar (%12,7) ve yaz mevsimi (%0,6) takip etmektedir [16].

2.2. Metot

Açılan profillerden alınan örnekler hava kuru şartlarda kurutulup, öğütüldükten sonra 2 mm'lik elekten geçirilerek, numuneler 2 kg'lık plastik kaplarda saklanmıştır. Toprak örneklerinde; Organik karbon yağ yakma [17], Tekstür hidrometre [18], Katyon değişim Kapasitesi [19], EC (Doygunluk çamurunda) [20], pH (Doygunluk çamurunda) [20], kireç (Scheiber kalsimetresi ile) [21], değişebilir katyonlar [22] ve hacim ağırlığı [23] analizleri yapılmıştır.



Şekil 1. Çalışma alanının konumu

3. Bulgular ve tartışma

3.1. Bulgular

Çalışma alanında farklı üç lokasyondan alınan toprakların bazı özellikleri Çizelge 1’de verilmiştir. Buna göre, topraklar nötr ve hafif alkali bir reaksiyona sahip olup, tuzluluk ve alkalilik problemleri yoktur. Katyon değişim kapasitesi (KDK) orta ve yüksek düzeyde bulunmuştur. En yüksek KDK işlenmemiş alanlarda tespit edilmiştir. Her üç bölgede alınan topraklar kil tekstürlüdür.

Toprak örneklerinin hacim ağırlıkları (HA) 1,26-1,61 Mg m⁻³, organik madde içeriği (OM) % 0,29-3,86, kireç düzeyleri % 23,21-42,50, organik karbon konsantrasyonları 0,13-7,67 kg m⁻², inorganik karbon konsantrasyonları 2,93-21,91 kg C m⁻² olarak saptanmıştır (Çizelge 2). Hacim ağırlığının en düşük değeri mera alanlarında 0-20 cm derinliğinde alınan örneklerde, en yüksek değer ise işlenmiş alanlarında 95-100 cm derinlikte alınan örneklerde tespit edilmiştir. Organik madde içeriği bakımında en yüksek değer işlenmemiş alanlarda 25-45 cm derinlikte, en düşük değer ise işlenmiş alanlarda 95-10 cm derinlikte alınan toprak örneklerinde saptanmıştır. Kireç içeriği en yüksek değer işlenmemiş alanlarda 0-25 cm, en düşük değer ise işlenmemiş alanlarda 0-25 cm toprak derinliğinde alınan toprak örneklerinde bulunmuştur. Organik karbon stokları en yüksek miktarı işlenmemiş alanlarda 45-90 cm, en düşük miktar ise işlenmiş alanlarda 95-10 cm toprak derinliklerinde alınan toprakta belirlenmiştir. İnorganik karbon stoklarında maksimum değer işlenmemiş alanlarda 50-90 cm, minimum değer ise 95-10 cm toprak derinliğinde alınan örneklerde rastlanmıştır.

Üç bölgede farklı kültivasyon koşulları altında alınan toprak örneklerinde belirlenen parametreler arasındaki korelasyonlar Çizelge 3’te verilmiştir. Toprakların HA

toprakların %OM ve organik karbon (OK) konsantrasyonları ile çok önemli (p<0.01) negatif bir ilişki bulunmuşken, inorganik karbon ve kireç içeriği ile önemsiz ancak pozitif bir ilişki belirlenmiştir. Toprakların % OM içeriği, kireç içeriği ile çok önemli (p<0.01), inorganik karbon içeriği ile önemsiz negatif bir ilişki saptanmıştır.

3.2. Tartışma

Bölgede Harran Ovasında yapılan çalışmada 100 cm toprak derinliğinde toplam karbon stokları (organik ve inorganik) 56,41 Tg C (1 Tg=10¹² g) saptanmış olup, bunun 20,16 Tg’ı TOK, 36,25 Tg’ı ise TİK olarak belirlenmiştir. Ortalama TOK miktarı en az Akören serisinde 7,14 Tg, en fazla Sırrın serisinde 11,40 Tg şeklinde saptanmıştır [24]. Karbon stoklarının düşük olması, iklimin kurak ve yarı kurak olması, aşırı kültivasyon, anızın yakılması veya hayvan yemi olarak kullanılması veya yakacak için toplatılması nedeni ile toprağa karbon girişinin az olmasına ve TOK’un azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Kültivasyon işlemleri TOK stoklarını %58 azaltmaktadır [25]. Güneydoğu bölgesinde işlenmemiş alanlar ile işlenmiş alanların karbon miktarları karşılaştırıldığında işlenmiş alanların işlenmemiş alanlara göre TOK miktarlarının yaklaşık olarak %58’inin kaybolduğu (p<0,01) ortaya çıkmıştır. Tarımsal alanlar arasında yapılan değerlendirmede ise önemli bir farkın olmadığı görülmüştür. Yapılan sürüm işlemleri toprağın yapısını bozmakta, erozyonu hızlandırmakta, oksidasyonu artırmakta ve böylece TOK stoklarını azaltmaktadır. Buna karşın korumalı kültivasyon işlemleri yukarıdaki negatif etkileri azaltmada önemli bir yöntem olabilmektedir. Bu nedenle korumalı sürümü gerek dünyada gerekse ülkemizde öne çıkarılması gerekmektedir [10].

Çizelge 1. Çalışma alanı topraklarının bazı özellikleri

Tarımsal Durum	pH (Sat. Ekst.)	EC (Sat. Ekst.)	Tekstür sınıfı	KDK (cmol kg ⁻¹)
İşlenmemiş	7,70-7,92	0,47-1,10	Killi	21,81-47-75
İşlenmiş	7,80-8,20	0,31-0,73	Killi	34,32-43,05
Mera	7,80-8,10	0,65-0,70	Killi	27,22-37,14

Çizelge 2. Örneklerin tanımlayıcı analizlerin karşılaştırılması

Toprak Parametreleri	Örnek Sayısı	t	df	Min.	Max.	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
Hacim Ağırlığı (Mg m ⁻³)	21	61,502	20	1,26	1,61	1,44	0,10	0,02
Organik Madde (%)	21	8,305	20	0,29	3,86	2,06	1,14	0,24
Kireç Miktarı (%)	21	26,439	20	23,21	42,50	29,99	5,19	1,13
Organik Karbon (kg m ⁻²)	21	7,797	20	0,13	7,67	3,73	2,19	0,47
İnorganik Karbon (kg m ⁻²)	21	10,176	20	2,93	21,91	11,74	5,29	1,15

Çizelge 3. Parametreler arasındaki korelasyon ilişkisi

Parametreler	Org. Madde (%)	Kireç Miktarı (%)	Org. Karbon (kg m ⁻²)	İnorg Karbon (kg m ⁻²)
Hacim Ağırlığı (Mg m ⁻³)	-0,878**	0,566**	-0,623**	0,407
Organik Madde (%)		-0,619**	0,769**	-0,385
Kireç Miktarı (%)			-0,705**	0,176
Organik Karbon (kg m ⁻²)				0,089

*p<0,05, **p<0,01

Hutchinson ve ark. [26], anız yakmanın 6 yıl gibi kısa bir sürede topraktan karbonun %30 – 50 oranında çok önemli kayıplara sebep olduğunu göstermişlerdir. Böylece yüksek sıcaklık, sınırlı yarıyışlı, zayıf ve düşük gübreleme, bitki artıkları yönetimindeki aksaklıklardan dolayı dünya topraklarının önemli bölümünde karbon içeriği giderek azaldığı gözlenmiştir. Kuru tarımsal ekosistemlerde Aridisol, Vertisol, Entisol'lerin olduğu rapor edilmiştir [27]. Bu ekosistemlerde kuraklık stresi biyomas üretimini sınırlandırarak temel değişken iken yetersiz azot ve düşük TOK konsantrasyonu düşük yıllık net bitkisel üretimin (YNBÜ) oluşmasına neden olmaktadır. TOK yoğunluğu (kg m^{-2}), üzerine vejetasyon, toprak tekstürü, arazi pozisyonu, toprağın yıkanması ve taşınması veya rüzgar erozyonu / depolanması gibi değişkenler etkili olduğu belirtilmiştir [2].

İşlenmiş ve işlenmemiş alanlarda yapılmış oldukları çalışmada, işlenmemiş alanların TOK konsantrasyonları ($20,32-23,86 \text{ kg C m}^{-2}$) işlenmiş alanların TOK konsantrasyonlarından ($7,30-9,54 \text{ kg C m}^{-2}$) yüksek, TİK konsantrasyonları ise ($40,1-52,0 \text{ kg C m}^{-2}$) daha düşük olduğu ($59,59-63,80 \text{ kg C m}^{-2}$) belirtmişlerdir [28]. Mevcut çalışmada işlenmiş alanların TOK konsantrasyonları ($8,07-8,29 \text{ kg C m}^{-2}$) işlenmemiş alanların TOK konsantrasyonlarından ($17,09-22,72 \text{ kg C m}^{-2}$) daha düşük çıkmıştır. İşlenmiş toprakların TİK konsantrasyonları ($60,83-64,23 \text{ kg C m}^{-2}$), işlenmemiş toprakların TİK konsantrasyonlarından ($40,12-44,90 \text{ kg C m}^{-2}$) daha yüksektir. Mera alanlarında yapılan çalışmalarda TOK konsantrasyonları $7,64-9,21 \text{ kg C m}^{-2}$, TİK konsantrasyonları ise $17,90-18,72 \text{ kg C m}^{-2}$ olarak tespit edilmiştir.

Post ve Kwon [29], Tarımsal faaliyetlerin yapıldığı alanlarda TOK'un düşük olmasının sebebi sürüm sırasında toprak agregatlarının kırılması ve hasat sonrası artıklarının toprağa karıştırılmamasında dolayı toprağa giren biyomasın azlığı sebep göstermişlerdir. Doğal alanların tarım alanlarına dönüştürülmesi de topraktan global TOK kayıplarına neden olmaktadır. Guo ve Gifford [30], çayırların orman alanlarına dönüştürülmesi durumunda TOK'un artmasına neden olacağını belirtmiş ancak bunu orman tipi ve yağışla ilişkilendirmiştir.

Sonuç itibarıyla dünyada yapılan pek çok çalışma [31-35] ile bizim yaptığımız çalışma arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Benzer iklim ve çevre koşulları altındaki benzer toprakların karbon stokları benzer olmaktadır.

Bölge topraklarının killi ve kireçli olması TOK stokları açısından olumlu bir parametre olarak görülmektedir. Killi ve kireçli topraklarda karbon organo – mineral komplekslerine dönüşerek toprakta daha uzun süre kalmaktadır [36]. Toprakların ağır bünyeli olması oksidasyonu yavaşlatmaktadır. Kil artıca agregasyon artmaktadır. Ayrıca yüksek kesimlerden ovalara sürekli organik maddece zengin üst toprağın taşınması ve birikmesi TOK stoklarının artmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. Kum veya kum tekstürüne yakın alanlarda TOK düşük çıkmaktadır [10].

4. Sonuç ve öneriler

Çalışma bölgesinin toprakları killi ve kireçli oluşu TOK stoklarının fazla olmasına neden olmuştur. Topraktaki karbon kil ve kireçle birleşerek organo – mineral komplekslere dönüşerek topraklarda daha uzun süre kalmasına neden olmaktadır.

Çalışma bölgesinde mera alanları ile tarımsal faaliyetin düzenli olarak yapıldığı alanlar karşılaştırıldığında organik maddenin yaklaşık % 51,92 oranında kaybolduğu ortaya çıkmaktadır. Mayınlardan arındırılmış alanlar ile işlenmiş alanlar karşılaştırıldığında, işlenmiş alanlarda organik maddenin %57,74' si kaybolmaktadır.

Bölge toprakları fiziki olarak şişme büzülme özelliğine sahiptir. Toprakların kireç oranlarının yüksek olması ise bu şişme ve büzülmeyle ilgili gibi topraklarda alkalileşmeyi de durdurduğu düşünülmektedir.

İşlemeli tarımın toprak organik karbon miktar ve stoklarını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Toprak işleme yapılırken topraklarda gereğinden fazla ve bilinçsizce ağır sürümün yapılması toprak organik stokları için bir dezavantajdır. Topraklarda yapılan ağır sürümün toprağın yapısı bozmakla beraber oksidasyonu ve erozyonu hızlandırmakta, toprak organik karbonun parçalanmasını azaltır. Bu sebeple korumalı toprak tekniklerinin ülkemizde geliştirilip yaygınlaştırılması gerekmektedir.

Tarımsal faaliyetin yapıldığı alanlarda korumalı sürüm teknikleri kullanılarak bitki artıkları ve anızlar korunmaktadır. Korunan bu bitki kalıntıları toprakların yüzey kısmını kaplayarak malç görevi görürler. Topraktan suyun depo edilmesini sağlayarak suyun depolanmasını sağlar. Toprak organik karbonun parçalanmasını azaltır. Bu sebeple korumalı toprak tekniklerinin ülkemizde geliştirilip yaygınlaştırılması gerekmektedir.

Çalışma bölgesi topraklarının killi tekstüre sahip olmaları toprak organik karbon birikmesi açısından önemlidir. Killi topraklarda havalanmanın az olması oksidasyonun da düşük olmasının sağlamaktadır. Bölgede iklimin sıcak olması birikimin fazla birikmesine engel teşkil etmektedir.

Kaynaklar

- [1] Paustian K., Babcock B., Kling C., Hatfield J.L., Lal R., Mccarl B., Mclaughlin S., Post W. M., Mosier A.R., Rice C., Robertson G.P., Rosenberg N.J., Rosenzweig C., Schlesinger W.H., Zilberman D., Climate change and greenhouse gas mitigation: challenges and opportunities for agriculture. council for agricultural science and technology. Task Force Report No. 141, 120p, 2004.
- [2] Lal R., soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security special section. Science, 34, 1549–1700, 2004.
- [3] Smith W.N., Grant B.B., Desjardins R.L., Qian B., Hutchinson J., Gameda S., Potential impact of climate change on carbon in agricultural soils in Canada 2000 – 2099. Climate Change, 93, 319–333, 2009.
- [4] West T.O., Post W.M., Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation. Soil Sci. Soc. Am. J., 66, 19–30, 2002.
- [5] Paustian K., Cole C.V., Sauerbeck D., Sampson N., CO2 mitigation by agriculture: an overview, Clim. Change, 40, 135–162, 1998.
- [6] Lal R., Potential of soil carbon sequestration in forest ecosystem. in: Lal, R., editor, 2001. soil carbon sequestration and the greenhouse effect. Soil Science Society of America Special Publication vol. 57, Madison, WI, pp. 137–154, 2001.
- [7] Falkowski P.G., Scholes R.J., Boyle E., The carbon cycle: a test of our knowledge of earth system. Science, 290, 291–296, 2000.
- [8] Eshel G., The role of soil inorganic carbon in carbon sequestration. Doctor of Philosophy in Soil Science and Biogeochemistry. California University, 51p, 2005.
- [9] Marland G., Boden T.A., Andres, R.J., Global, regional and national CO2 emissions.

- http://cdiac.ornl.gov/trends/emis/meth_reg.html, USA, 2007.
- [10] Sakin, E.. Güneydoğu Anadolu Bölgesi topraklarının karbon stokları ve dengesi. HRÜ. Fen Bil. Enst. (Doktora Tezi), 234s, 2010a.
- [11] Schlesinger W.H., Andrews J.F., Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*, 48, 7–20, 2000.
- [12] Houghton R.A., Balancing the global carbon budget. *annual review of Earth and Planetary Sciences*, 35, 313–347, 2007.
- [13] Amundson R., The carbon budget in soils. *annu. rev. Earth Planet. Sci.*, 29, 535–562, 2001.
- [14] Batjes N.H., Sombroek W.G., Possibilities for carbon sequestration in tropical and subtropical soils. *Global Change Biol.*, 3, 161– 3, 1997.
- [15] Janzen H.H. Carbon cycling in earth system – a soil science perspective. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 104, 399–417, 2004.
- [16] Kılıç T., Nusaybin'in fiziki coğrafya özellikleri. *D.Ü.Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi* 10, 106-117, 2008.
- [17] Walkley A.A., Critical examination of a rapid method for determining organic carbon of soils. *Soil Sci.*, 63, 251–263, 1947.
- [18] Bouyoucus G.J., A Recalibration of the Hydrometer for Making Mechanical Analysis of Soils. *Agron. Jour.*, 3, 434–438, 1951.
- [19] Jackson M.L., *Soil Chemical analysis*. Prentice - Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 498p, 1958.
- [20] Janzen H.H., Soluble Salts. In Carter, Martin R. (ed.) *Soil sampling and methods of analysis*. Lewis Publisher, pp 161– 66, USA, 1993.
- [21] Allison L.E., Moodie C.E. Carbonate., In: C.A, Black (ed). *Methods of Soils Analysis. Part 2. Agronomy 9 (1)*. Am. Soc. of Argon., Inc., Madison, pp. 1379 – 1400, Wisconsin U.S.A, 1965.
- [22] Hesse P.R., *A text book of soil chemical analysis*. Chemical Publishing Co., pp 1 – 520, Inc. New York, 1972.
- [23] Black C.A., *Methods of soil analysis, Part II*, American Soci. of Agroninc. Pub. No: 9 Madison WI., 1965.
- [24] Sakin E., Deliboran A., Sakin E.D., Tutar E. Carbon stocks in harran plain soils, Sanliurfa, Turkey. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.*, 38 (3), 151-156, 2010b.
- [25] Sakin, E., Carbon balance and stocks in soils of south-eastern region (SAR). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11 (3&4), 2186-2189, 2013a.
- [26] Hutchinson J.J., Campell R.L., Desjardins R.L., Some perspectives on carbon sequestration in agriculture. *Agricultural and Forest Meteorology*, 142, 288–302, 2007.
- [27] Dregne H.E., *Soils of Arid Regions*. Elsevier, Amsterdam, 312 p, 1976.
- [28] Sakin E., Sakin E.D., The comparison of carbon stocks in cleared land-mined and surrounding agricultural soils. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11 (3&4), 433-2435, 2013b.
- [29] Post W., Kwon K.C., Soil carbon sequestration and land - use change: processes and potential. *Global Change Biology*, 6, 317–327, 2000.
- [30] Guo L.B., Gifford R.M., Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Glob. Chang. Biol.*, 8, 345–360, 2002.
- [31] Brahim N., Bernoux M., Blavet D., Gallali T., Tunisian soil organic carbon stocks. *International Journal of Soil Science* 5(1), 34-40, 2010.
- [32] Nadhem B., Gallali T., Blaveta D., Bernoux M., Soil organic carbon stocks at Tunisia scale for different soil types. *10th International Meeting on Soils with Mediterranean Type of Climate*. CNRS Press, Beirut, Lebanon, pp. 107-111, 2009.
- [33] Neufeldt H., Carbon stocks and sequestration potentials of agriculture of soils in the Federal State of Baden-Württemberg SW Germany. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 202-211, 2005.
- [34] Grabe M., Kleber M., Hartmann K.J., Jahn R., Preparing a soil carbon inventory of saxony-anhalt, central germany using gis and the state soil data base SABO P. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166, 642-648, 2003.
- [35] Sakin E., Deliboran A., Sakin E.D., Aslan H. Carbon and nitrogen stocks and C:N ratios of harran plain soils. *Romanian Agricultural Research*, 28, 171-180, 2011.
- [36] Bruke I.C., Yonkar C.M., Parton W.J., Cole C.V., Flach K., Schimel D.S., Texture, climate and cultivation effects on soil organic matter content in us grassland soils. *Soil Science Society of America Journal*, 53, 800–803, 1989.



Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes

Pınar Guller¹, Aysegul Bayındır¹, Orhan Erdogan¹, Mehmet Ciftci*²

Abstract

Glutathione reductase is a key enzyme in glutathione metabolism and very important for antioxidant system in metabolism. Therefore, in this study rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) erythrocytes glutathione reductase was purified with a fast and simple purification procedure and investigated some kinetic properties of enzyme. The enzyme was purified with DEAE-Sephadex ion exchange, 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity and Sephadex G-150 chromatography methods and enzyme purity was controlled by SDS-PAGE. For the enzyme, optimum pH, optimum temperature, optimum ionic strength, and stable pH were found to be 8.0, 60 °C, 160 mM, and 7.5, respectively. The molecular weight of the enzyme was found to be ~131 kDa by Sephadex G-200 gel filtration chromatography and the subunit molecular weight was found to be ~70 kDa SDS-PAGE. In addition, K_{Mapp} values for NADPH and GSSG and V_{maxapp} were determined to be 0.022 mM, 0.54 mM and 0.0648 U/mg-protein respectively. Rainbow trout erythrocytes GR enzyme was isolated and characterized for the first time.

Keywords: Glutathione reductase; rainbow trout; purification

Glutasyon redüktaz enziminin alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu

Özet

Glutasyon redüktaz enzimi, metabolizmada antioksidan sistem ve glutasyon metabolizması için kilit bir enzimdir. Bu öneminden dolayı bu çalışmada alabalık eritrositlerinden ilk defa etkin ve basit bir saflaştırma metodu kullanılarak saflaştırıldı ve bazı kinetik özellikleri araştırıldı. Enzim DEAE-Sephadex iyon değişim, 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite ve Sephadex G-150 kromatografi metotları ile saflaştırılarak enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Enzim için optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet ve stabil pH sırasıyla 8,0, 60°C, 160 mM, ve 7,5 olarak hesaplandı. Enzimin tabii molekül kütlesi Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile ~131 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise SDS-PAGE ile ~70 kDa olarak bulundu. Ayrıca NADPH ve GSSG için K_M değerleri sırasıyla 0,022 ve 0,0648 mM, V_{max} değeri ise 0,0648 U/mg-protein olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon redüktaz; alabalık; saflaştırma

1. Introduction

Glutathione reductase (GR) enzyme (Glutathione: NADP⁺ oxidoreductase, E.C.1.8.1.7; GR) converts glutathione disulfide (GSSG) to reduced glutathione (GSH). It is a member of the flavoenzymes group. GR enzyme plays a critical role in keeping a high percentage of [GSH]/[GSSG] [1]. GSH is the main non-protein sulfhydryl compound in every organism. Research has shown that GSH is a part of the completion of peptide synthesis and protein organization in the formation of the deoxyribonucleotid precursors of DNA, in keeping sulfhydryl groups in the cell peptides as well as in the conservation of the cells from radicals and ROS, such as O₂·, ·OH and H₂O₂ [2].

As can be seen from the above literature review GR enzyme is very important. It has been purified from many different sources, such as rat liver [3,4], calf liver [5], gerbil liver [6], human erythrocytes [7,8], bovine erythrocytes [9], porcine erythrocytes [10], sheep brain [11] and rainbow trout liver [12], and some of its characteristic properties have been established.

This flavin enzyme is essential for reduction of glutathione disulfide (GSSG) to the reduced form (GSH), necessary for protection of cells against oxidative stress as an antioxidant. For this reason this enzyme was purified from rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and investigated some kinetic properties.

Also, to the best of our knowledge, there is no report in the literature on the purification and characterization of GR enzyme from rainbow trout erythrocytes.

¹ Faculty of Science, Ataturk University, 25030 Erzurum, Turkey

² Faculty of Science and Arts, Bingol University, 12000 Bingol, Türkiye

*Corresponding author E-mail: mciftci@bingol.edu.tr

2. Material and methods

2.1. Materials

2', 5'-ADP Sepharose 4B was obtained from Pharmacia. All other chemicals were obtained from either Sigma-Aldrich or Merck.

2.2. Fish husbandry and maintenance

The rainbow trout (n: 10) used in the research were ripe, about 3-4 years-old, and had with an average weight of 1.5-2.0 kgs. Water temperature was 9 ± 2 °C during the research. Samples were collected according to the technique for collection of samples specified by Ciftci et al. [13].

2.3. Preparation of hemolysate

Blood tissue was obtained from the caudal vein of fish using a 5 mL plastic injector. It was then, transferred into Vacutainer® tubes (heparinized 5 IU/mL) and centrifuged at $2,500 \times g$ for 15 minutes. Next, the plasma was removed from the tube. Erythrocyte pellets were washed with KCl solution (0.16 M) approximately three or four times. The samples were then, re-centrifuged at $2,500 \times g$ and supernatant was removed. The erythrocytes were hemolysed with 4-5 volumes of ice-cold water and centrifuged (at 4 °C, $10,000 \times g$) for 40 minutes to remove the cell membranes [13].

2.4. Ammonium sulphate fractionation and dialysis

Ammonium sulphate precipitation was used to obtain the partial purification between 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70% and 70-80%. The mixture was centrifuged at $5,000 \times g$ for 15 minutes and sediment was dissolved in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), while the enzyme activity was identified both in supernatant and sediment each time. At the end, the enzyme solution was dialyzed at 4 °C in 10 mM Tris-HCl buffer + 1mM EDTA (pH 8.5) for 2 hours [13].

2.5. Purification of GR by ion exchange chromatography

Ion-exchange chromatography material was prepared by DEAE-Sephadex. It was then equilibrated and washed with a 50 mM Tris-HCl buffer containing 1mM EDTA and 1mM DTT (pH 8.5). The flow velocity for washing and equilibration was set by a pump at 20 mL/h. The ammonium sulphate sample was then loaded on an ion exchange column and the gel was washed with the same buffer until the absorbance of the eluate at 280 nm was lower than 0.05. Proteins were eluted with a gradient of KCl ranging from 0 to 2 M in a 50 mM Tris-HCl buffer containing 1mM EDTA and 1mM DTT (pH 8.5) at the flow rate of 20 mL/h. Elutes were gathered in 2 milliliter tubes. Activity and absorbance were separately calculated at 340 nm and 280 nm respectively in the elute tubes. Then, the tubes that displayed action were collected. All of the studies were conducted at 4 °C [14].

2.6. 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography

The enzyme sample obtained previously was loaded onto the 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column, and then the column was washed with a 50 mM K-phosphate buffer containing 1 mM EDTA, 1 mM DTT (pH 7.3). The washing procedure lasted until the last absorbance difference reached 0.05 at 280 nm. Then the enzyme was eluted with 50 mM

KH₂PO₄ buffer containing 1 mM EDTA, 1mM GSH and 0.5 mM NADPH (pH 7.3). Finally, active tubes were collected and dialyzed with an equalization solution. All of the experiments were performed at 4 °C [6,10].

2.7. Sephadex G-150 gel filtration chromatography

The enzyme purified from 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography was loaded on to Sephadex G-150 column. Thus NADPH was removed from the enzyme solution. The K_{Mapp} constants for GSSG and NADP⁺ and V_{maxapp} value were determined by this enzyme sample.

2.8. Activity determination

The Enzyme activity was determined spectrophotometrically with a Shimadzu Spectrophotometer UV-(1208), at 25 °C, according to the method of Carlberg and Mannervik [14]. One enzyme unit (U) was defined as the enzyme amount reducing 1 μ mol NADP⁺ per 1 minute at 25 °C.

2.9. Protein determination

Quantitative protein determination was started spectrophotometrically at 595 nm according to Bradford's method, with bovine serum albumin being used as a standard [15].

2.10. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed according to Laemmli's method in order to check the purity of the enzyme [16]. The acrylamide concentrations of the stacking and the separation gels were 3% and 8%, respectively, including 0.1% SDS.

2.11. Stable pH determination

In order to calculate stable pH, equal volumes of the buffers (K-phosphate at pH of 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, and Tris-HCl at pH of 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0) and purified enzyme were stirred and preserved in a refrigerator (4 °C). Enzyme activity was determined once every 12 hours.

2.12. Optimum pH determination

In order to obtain optimum pH, K-phosphate, Tris-HCl and glycine-NaOH buffers were used within the pH value of 5.5 to 8.0; 7.5 to 9.0, and 8.5 to 10, respectively.

2.13. Optimum temperature determination

In order to obtain the optimum temperature, enzyme activity was determined in the temperature range from 0 °C to 80 °C. The desired temperature was obtained through a Polyscience bath (model 9105).

2.14. Ionic strength determination

In order to obtain the optimum ionic strength, enzyme activity was conducted using various concentrations of K-phosphate buffer, pH 8.0 ranging from 10 to 1000 mM.

2.15. Molecular weight determination

2.15.a. Sephadex G-150 gel filtration

The molecular weight of the enzyme was obtained according to Andrew's method [17]. Bovine erythrocyte carbonic anhydrase-I (29 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), yeast alcohol dehydrogenase (150 kDa), and sweet

potato β -amylase (2000 kDa) were used as standards (Sigma: MW-GF-200).

2.15.b. SDS-PAGE

The sub-unit of enzyme calculation was conducted by SDS-PAGE. Bovine serum albumin (85 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (35 kDa), and beta-lactoglobulin (25 kDa) were used as standards (Thermo Scientific: 26612).

3. Results

In this study, the rainbow trout erythrocytes GR enzyme was isolated and characterized. The purification procedure was carried out by the hemolysate preparation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography, 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography and Sephadex G-150 gel filtration chromatography. Enzyme was purified with a specific activity of 0.3656 U/mg protein, a yield of 24.79% and a purification coefficient of 988. Finally, purity of enzyme was checked by SDS-PAGE (Figure 1).

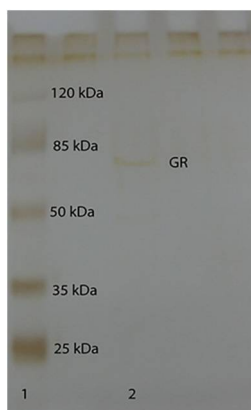


Figure 1. Purification control of GR from the Sephadex G-150 column by SDS-PAGE (Line 1: Standard proteins, line 2: GR from affinity column)

The molecular weight of the subunits of enzyme was calculated as ~70 kDa. The molecular weight of the enzyme was also determined by gel filtration as ~131 kDa. Optimal pH of GR has been determined as 8.0 using 100 mM K-phosphate (Figure 2).

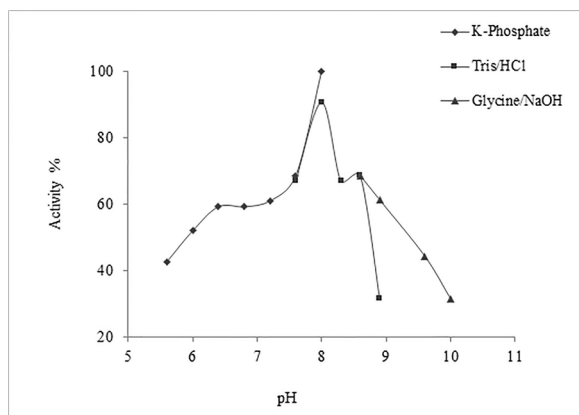


Figure 2. pH-Activity graph as a result of optimum pH studies of rainbow trout erythrocytes GR

The optimal ionic strengths were determined as 160 mM K-phosphate for rainbow trout erythrocyte GR (Figure 3).

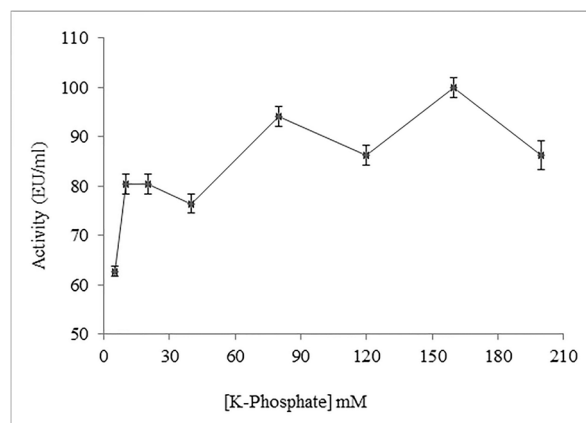


Figure 3. Optimum ionic strength for rainbow trout erythrocytes GR using different concentrations of KH_2PO_4 buffer solutions

When the stable pH profile of the enzyme was examined it was seen that the enzyme showed a maximum activity of 100% at the end of 3.5 days in a 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). The enzyme was seen to show the highest activity at 60 °C (Figure 4).

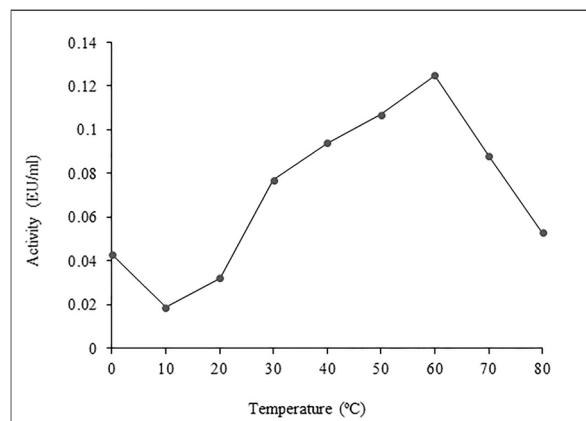


Figure 4. Temperature- Activity graph for determining the optimum temperature of rainbow trout erythrocytes GR

The K_{Mapp} values for NADPH and GSSG and V_{maxapp} were determined to be 0.022 mM, 0.54 mM, 0.0648 U/mg from Figures 5 and 6 respectively.

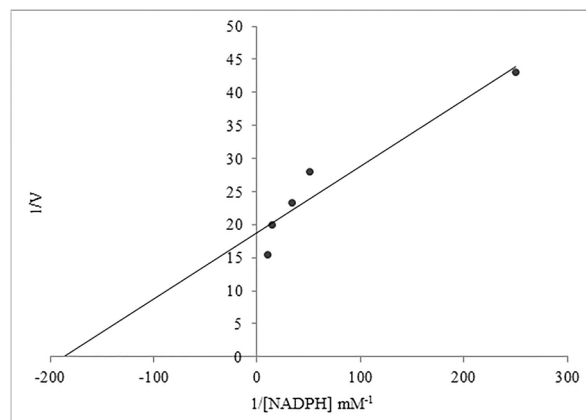


Figure 5. Lineweaver–Burk graph of five different NADPH concentrations (0.01, 0.02, 0.03, 0.07 and 0.1 mM) with a fixed GSSG concentration (0.2 mM) for determining K_{Mapp} and V_{maxapp} values

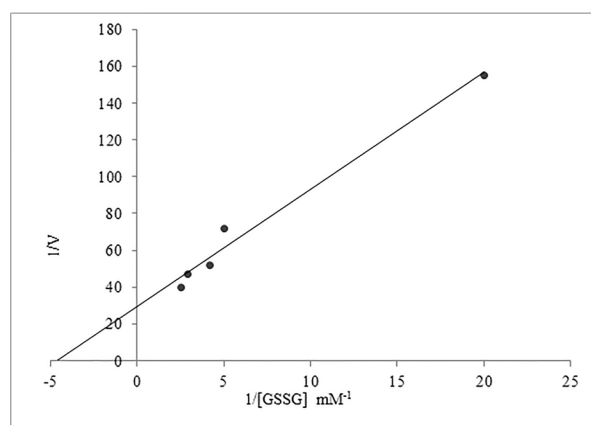


Figure 6. Lineweaver–Burk graph of five different GSSG concentrations (0.2, 0.24, 0.34 and 0.4 mM) with a fixed NADPH concentration (0.02 mM) for determining K_{Mapp} value

4. Discussion

The undesirable biologic effects of oxidative agents, such as free radical and reactive oxygen species (ROS), are removed by enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence systems. Many enzyme systems, such as glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase, catalase, aldoketoreductase and DNA repair enzymes, enhance enzymatic defense. Non-enzymatic antioxidant defence systems include many different agents, such as vitamins, transferrin, ceruloplasmin, lactoferrin, uric acid, taurine, GSH, cysteamine, cysteine and thioredoxin [19].

Glutathione reductase catalyzes the reduction of GSSG in the presence of NADPH, which is produced in the pentose phosphate metabolic pathway by glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD). The GSH is a product of the reaction catalyzed by glutathione reductase. GSH-related enzyme system is one of the most important protective systems in cells. Reduced glutathione is used in detoxification of xenobiotics, as a protection of the thiol groups of intracellular proteins, in scavenging of H_2O_2 and other organic peroxides, and as a counteraction of oxidative events. The first step, in the detoxification of xenobiotics, consists of GSH conjugates owing to its high nucleophilic

potency. These reactions are catalysed by glutathione transferases (GSTs) [20]. These conjugates can be further metabolised into the corresponding cysteine conjugates. Cysteine conjugates can also be N-acetylated to yield mercapturic acids [21]. In the other reaction of glutathione, disulphides present in the proteins are also converted into thiols by trans hydrogenates. In these reactions, GSH is converted to GSSG, where its high concentrations can also cause inhibition of some enzymes including protein synthesis [22].

In this study, the rainbow trout erythrocytes GR enzyme was isolated and characterized for the first time. The purification procedure was then, carried out by the hemolysate preparation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography, 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography and Sephadex G-150 gel filtration chromatography. After the four consecutive steps were accomplished, the enzyme was purified from hemolysate. During the washing procedure, both absorbance and activity of samples were measured spectrophotometrically at 280 and 340 nm, respectively. Table 1 shows the purification of enzyme characterized by a specific activity of 0.3656 U/mg protein, a yield of 24.79% and a purification coefficient of 988.

Finally, the obtained highly pure enzyme exhibited a single band on SDS-PAGE (Figures 1). These results reveal that the procedure used in the purification is good enough to be used in other studies. Another advantage of this procedure is that a shorter experimental time is needed (approximately 18 to 19 hours).

Figure 1 exhibits the SDS-PAGE applied for the determination of purity and molecular weight of the enzyme. A high purity for the enzyme has been obtained. The molecular weight of the subunits of enzyme was calculated as ~ 70 . The molecular weight of the enzyme was also determined by gel filtration as ~ 131 kDa. The two molecular weights were different from each other, suggesting that the enzyme was a homodimer in active state. GRs of different origin have similar molecular weight as follows: 65 kDa (homodimer) 52 kDa (homodimer) and 55 kDa (homodimer) from turkey liver, rainbow trout and mouse liver by gel filtration and SDS-PAGE, respectively [12,23,24].

Optimal pH of GR has been determined as 8.0 using 100 mM K-phosphate (Fig. 2). The pH determined was different from that in previous studies [9,24,25] although it was the same as the rainbow trout liver GR [12]. The optimal ionic

Table 1. Purification steps of glutathione reductase enzyme

Purification step	Activity (EU/mL)	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total protein (mg)	Total activity (EU/mL)	Specific activity (EU/mg)	Yield (%)	Purification factor
<u>Haemolysate</u>	0.0240	16	64.9500	1039.130	0.384	0.00037	100	1
Ammonium sulfate precipitation (40-65%)	0.0480	7	11.2500	78.760	0.336	0.00430	87.50	11.620
<u>DEAE-Sephadex</u>	0.0053	22	0.8610	18.960	0.116	0.00610	30	16.480
<u>2', 5'- ADP Sepharose 4B affinity chromatography</u>	0.0080	15	0.0197	0.295	0.121	0.40900	31.51	1,105
<u>Sephadex G-150</u>	0.0068	14	0.0186	0.2604	0.095	0.36560	24.79	988

strengths were determined as 160 mM K-phosphate for rainbow trout erythrocyte GR (Fig. 3). This result is different from rainbow trout liver GR [12], bovine erythrocyte GR [9] and turkey liver GR [24]. The stable pH profile of the enzyme was able to be determined at six different pHs using 100 mM Tris-HCl and 100 mM K-phosphate buffers. The enzyme showed a maximum activity of 100% at the end of 3.5 days in a 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). The enzyme was seen to show the highest activity at 60 °C (Fig. 4) in a study of temperatures between 0-80 °C *in vitro* conditions. Optimal temperatures of GRs purified from a variety of sources were found between 10 °C and 50 °C [12,24,25,26]. The optimum temperature shows that the enzyme is more resistant to denaturation. Generally, enzymes lose their activities above 50 °C. This situation may be considered as an advantage for this enzyme *in vitro* condition. The optimum temperature for trout liver GR enzyme was found to be 10 °C [12]. On the contrary, the optimum temperature for trout erythrocytes GR enzyme was found to be 60 °C in this study. The reason of this difference is the probability of being isoenzyme.

The K_{Mapp} values for NADPH and GSSG and V_{maxapp} were determined to be 0.021 mM, 0.54 mM, 0.0648 U/mg from Figures 5 and 6 respectively. The K_{Mapp} for GSSG is higher than that for NADPH, suggesting the higher affinity of GR to NADPH when compared with GSSG. These K_{Mapp} values are different from those obtained in bovine liver [25], mouse liver [23], bovine erythrocyte [9], rainbow trout liver [12], sheep liver [27] and turkey liver [24].

References

- Schirmer RH., Krauth-Siegel RL., Schulz GE., In Coenzymes and Cofactors; Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic, O., Eds, Wiley: New York, USA, Vol. 3, pp. 553-559, 1989.
- Gul M., Kutay FZ., Temocin S., Hanninen O., Cellular and clinical implications of glutathione. *Ind. Exp. Biol.*, 38, 625-634, 2000.
- Carlberg I., Mannervik B., Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver. *J. Biol. Chem.*, 250, 5475-5480, 1975.
- Carlberg I., Altmejd B., Mannervik B., Purification and Immunological Studies of Glutathione Reductase from Rat Liver. Evidence for an Antigenic Determinant at the Nucleotide-Binding Domain of the Enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, 677, 146-152, 1981.
- Carlberg I., Mannervik B., Purification and characterization glutathione reductase from calf liver. An Improved Procedure for Affinity Chromatography on 2', 5'-ADP Sepharose 4B. *Anal. Biochem.*, 116:531-536, 1981.
- Le Trang, N. Bhargava, K.K. Cerami, A.1983. Purification of Glutathione Reductase from Gerbil Liver in Two Steps. *Anal. Biochem.*, 133, 94-99.
- Worthington DJ., Rosemeyer MA., Human Glutathione Reductase: Purification of the Crystalline Enzyme from Erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 48, 167-177, 1974.
- Krohne-Ehrich G., Schirmer RH., Untucht-Grau R., Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. Isolation of the Enzyme and Sequence Analysis of the Redox-Active Peptide. *Eur. J. Biochem.*, 80, 65-71, 1977.
- Erat M., Sakiroglu, H., Ciftci M., 2003. Purification and characterization of Glutathione Reductase from Bovine Erythrocytes. *Prep. Biochem. Biotechn.*, 33, 283-299, 2003.
- Boggaram V., Brobjer T., Larson K., Mannervik B., Purification of Glutathione Reductase from Porcine Erythrocytes by the Use Of Affinity Chromatography on 2', 5'-ADP-Sepharose 4B and Crystallization of the Enzyme. *Anal. Biochem.*, 98, 335-340, 1979.
- Acan NL., Tezcan, EF., Sheep Brain Glutathione Reductase: Purification and General Properties. *FEBS Lett.*, 250, 72-74, 1989.
- Tekman B., Ozdemir H., Sentürk M., Ciftci M., Purification and Characterization of Glutathione Reductase from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Liver and Inhibition Effects of Metal Ions on Enzyme Activity. *Comparative Biochemistry and Physiolog Part C*, 148, 117-121, 2008.
- Ciftci M., Ciltas A., Erdogan O., Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Erythrocytes. *Vet. Med. Czech.*, 49 (9), 327-333, 2004.
- Carlberg I., Mannervik B., 1985. Glutathione Reductase Assay, *Methods in Enzymol.* Academic Press, Orlando FL, 113, pp. 484-495, 1985.
- Bradford MM., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-251, 1976.
- Laemmli DK., Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683, 1970.
- Andrews P., The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to Their Molecular Weights Over a Wide Range. *Biochem J.*, 96, 595-606, 1965.
- Lineweaver H., Burk D., The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-660, 1934.
- Meister A., Glutathione Metabolism and its Selective Modification. *J. Biol. Chem.*, 263, 17205-17208, 1988.
- [20] Beckett GJ., Hayes JD., Glutathione S-transferases: Biomedical Applications. *Adv. Clin. Chem.*, 30, 281-380, 1993.
- Van Welie RT., Van Dijck RG., Vermeulen NP., Van Sittert NJ., Mercapturic Acids, Protein Adducts, and DNA Adducts as Biomarkers of Electrophilic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 271-306, 1992.
- Deneke SM., Fanburg BL., Regulation of Cellular Glutathione. *Am. J. Physiol.*, 257, L163-L173, 1989.
- López-Barea J., Lee C., Mouse-Liver Glutathione Reductase Purification, Kinetics, and Regulation. *Eur. J. Biochem.*, 98, 487-499, 1979.
- Taser P., Ciftci M., Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 36 (5), 546-553, 2012.

- [25] Ulusu NN., Tandoğan B., Purification and Kinetic Properties of Glutathione Reductase from Bovine Liver. *Mol. Cell. Biochem.*, 303, 45-51, 2007.
- [26] Turkoglu V., Altun M., Ciftci M., Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Lake Van fish (*Chalcalburnus tarichii pallas*, 1811) liver. *J. Physiol. and Biochem.*, 62 (3), 155-162, 2006.
- [27] Ulusu G., Erat M., Ciftci M., Sakiroglu H., Bakan E., Purification and Characterization of Glutathione Reductase from Sheep Liver. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 1109-1117, 2003.



Sığırlarda ana yaşının süt biyokimyasal parametreleri üzerine etkisi

Tolga İNAL¹, Murat ÇİMEN*¹

Özet

Bu çalışmanın amacı süt sığırlarında ana yaşının süt biyokimyası üzerine etkisini araştırmaktır. Veriler benzer laktasyon dönemindeki 20 adet Holstein ırkı sığırdan elde edilmiştir. Toplam yağ, protein, laktoz ve pH gibi tüm süt biyokimyasal parametreleri yedi yaş ve altındaki grup ile yedi yaş üstü grup arasında farklı bulunmamıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre süt sığırlarında ana yaşı; toplam yağ, protein, laktoz ve pH seviyelerine etki etmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Süt; biyokimyasal parametre; sığır; yaş

The effect of dam age in dairy cattle on milk biochemical parameters

Abstract

The objective of this study is to investigate the effect of dam age in dairy cattle on milk biochemistry. The data were obtained 20 Holstein cows in similar lactation period. All biochemical parameters such as total fat, protein, lactose, pH levels did not differ between under seven and seven years group and older group. According to the results of this research, the dam age in dairy cattle has not influence milk total fat, protein, lactose and pH levels.

Keywords: Milk; biochemical parameter; cow; age

1. Giriş

Çoğu Avrupa ülkesinde sütün fiyatının belirlenmesinde bakılan ilk kriter sütün miktarından çok biyokimyasal parametreleri olmaktadır. Çünkü süt parametreleri gerek ekonomik öneme sahip olması, gerekse de AB ülkelerinde süt yağı gibi parametrelerin destek kapsamında olması gibi nedenlerden dolayı vazgeçilemez bir öneme sahiptir [1]. ABD ve Avrupa ülkelerinde sütün fiyatının oluşmasını sağlayan mekanizmalarda sütteki kuru madde, yağ ve protein içeriği geleneksel olarak dikkate alınmakta ve özellikle süt tozu, tereyağı (süt yağı), peynir (süt gerçek protein düzeyi) fiyatları ve ham süt fiyatlarının belirlenmesinde dikkate alınmaktadır [2]. Süt biyokimyasal faktörleri üzerine hayvansal ve çevresel faktörlerin önemli derecede etkisi bulunmaktadır [3]. Zaten biyokimyasal parametre değişimini belirleyen etkenler hayvansal ve çevresel faktörlerden ibarettir. Hayvan yaşı da hayvansal faktörler arasında süt biyokimyasal parametrelerine etki eden bir unsur olarak ele alınıp değerlendirilmelidir [4]. Bu bilgiler ışığında Tunceli ilinde yetiştirilen süt sığırlarında süt parametreleri bakımından farklı yaş grupları arasında farklılıkların olup olmadığını görmek amacıyla bu araştırma planlanmıştır.

2. Materyal ve metot

Tunceli ili Merkez ilçede yürütülen araştırmada 3-7 ve 7-9 yaş aralığındaki Holstein ırkı sığırlarda süt parametreleri ele alınmıştır. Araştırmada 7 yaş ve öncesi (3-7) ile 7 yaş sonrası (7-9) olarak iki yaş grubu oluşturulmasının temel nedeni devletin büyükbaş hayvan süt sığırları için yaşam sigortası olarak 7 yaş sınırını koymuş olmasıdır [5]. Araştırma verileri her bir grupta 10 ar adet olacak şekilde 20 adet sığırdan elde edilmiştir. Hayvanlardan Aralık ayının ilk 3 haftası boyunca her haftanın son günü süt numuneleri alınarak, Funke Gerber Lactostar,3510 analiz cihazı yardımıyla süt parametreleri belirlenmiştir. Herhangi bir kimyasal madde kullanılmadan 10 ml. kadar bir süt örneği numune kabına konulup, 90 saniye sonra cihazdan ilgili değerler okunmuştur. Üç hafta boyunca değerlerin elde edilerek her bir hafta için ayrı ayrı karşılaştırılma yapılmasının nedeni biyokimyasal parametrelerde gruplar arasında görülebilecek farklılıklarda tek bir haftaya bağlı kalınmaması ve en az 3 tekerürlü hafta şeklinde farklılıkların belirlenerek bulunacak sonuçlara güvenilirliğin artırılmasına çalışılmıştır.

2.1. Süt analizi

Süt numunesi alınırken numunenin tüm kitleyi temsil etmesi istenmektedir. Bunun içinde meme birkaç kez dışarı sağılmış ve daha sonra steril numune kaplarına her meme

¹ Tunceli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye

*Sorumlu yazar E-posta: mcimen@tunceli.edu.tr

parmağından eşit seviyede sağım sayısı olacak şekilde 50 ml. kadar süt elde edilmiştir. Sağıldığı hayvanın numarasını taşıyan numune kapları ağız kapatıldıktan sonra analiz yapabilmek amacıyla hızlı bir şekilde laboratuvara alınmıştır. Analize geçmeden önce cihaz 2 sefer saf su ile yıkanmış, bir kere boş çalıştırılmış ve her numune kabından 10 ml cihazın numune kabına alınıp cihaza okutulmuştur. 90 sn içinde okunan değerler not alınmıştır. Numune kabı saf su ile durulanıp kurutulmuş ve bütün numune kapları için aynı işlem sırayla uygulanmıştır. Sütün pH değerleri el tipi pH-metre (Thermo Orion 3 Star) ile okunmuştur. 3 hafta boyunca haftada 20 adet sığırdan 1'er adet süt numunesi alınarak toplamda 60 numunenin pH değerleri pH-metre ile okunmuştur.

2.2. İstatistikî analizler

Araştırmada farklı yaş grupları arasında süt biyokimyasal parametreleri bakımından farklılıkların belirlenmesinde Bağımsız iki örnek T-testi analizinden yararlanılmıştır [6]. İlgili analizin yapılmasında SPSS 18.00 paket programı kullanılmıştır [7].

3. Araştırma bulguları ve tartışma

Araştırmada farklı yaş grupları arasında süt parametreleri bakımından farklılıkları ortaya koymak amacıyla bağımsız iki örnek T-testi analizi yapılmıştır. Çizelge 1'de haftalık yağ analiz sonuçları görülmektedir.

Çizelge 1. Aralık ayı haftalık süt yağ analizi (%)

Aralık	3-7 yaş grubu		7 yaş üstü grup	
1. Hafta	3,4413 ± 0,050	ÖS	3,4194 ± 0,060	ÖS
2. Hafta	3,4300 ± 0,053	ÖS	3,4431 ± 0,062	ÖS
3. Hafta	3,4136 ± 0,011	ÖS	3,4125 ± 0,039	ÖS

ÖS Önemsiz (p>0,05)

Çizelge 1'den de görüldüğü gibi 1., 2. ve 3. haftalarda elde edilen sütlerde yağ içeriği bakımından farklı yaş grupları arasında önemli istatistikî farklılıklara rastlanılmamıştır (p>0,05). Yıldırım ve ark. [8]'nin farklı yaşlara sahip sığırlarda süt yağ parametreleri arasında farklılık görülmediğini bildiren çalışmaları araştırma sonuçlarımızı destekler mahiyettedir. Ayrıca araştırmada bulunan süt yağ ortalamaları Koneko ve ark [9]'nin sığırlar için bildirdiği normal süt yağ değerleri ile uyum içinde bulunmuştur. Çizelge 2'de protein değerlerine ait ortalamalar görülmektedir.

Çizelge 2. Aralık ayı için haftalık protein analizi (%)

Aralık	3-7 yaş grubu		7 yaş üstü grup	
1. Hafta	3,2794 ± 0,033	ÖS	3,2718 ± 0,035	
2. Hafta	3,2491 ± 0,040	ÖS	3,2416 ± 0,032	
3. Hafta	3,1219 ± 0,032	ÖS	3,1271 ± 0,072	

ÖS Önemsiz (p>0,05)

Çizelge 2'ye bakıldığında 1,2 ve 3.hafta elde edilen sütlerde protein içeriği bakımından gruplar arasında istatistikî farklılıklara rastlanılmadığı dikkati çekmektedir (P>0,05).

Çizelge 3'e bakıldığında tüm haftalarda elde edilen laktöz içeriği bakımından gruplar arasında istatistikî farklılıklara rastlanılmamıştır (P>0,05).

Çizelge 3. Aralık ayı için haftalık laktöz analizi (%)

Aralık	3-7 yaş grubu		7 yaş üstü grup	
1. Hafta	4,8172 ± 0,051	ÖS	4,8681 ± 0,043	
2. Hafta	4,4252 ± 0,052	ÖS	4,3683 ± 0,031	
3. Hafta	4,6366 ± 0,042	ÖS	4,6282 ± 0,082	

ÖS Önemsiz (p>0,05)

Çizelge 4'den de görüldüğü gibi elde edilen pH içerikleri bakımından tüm haftalarda gruplar arasında istatistikî farklılıklara rastlanılmamıştır (P>0,05). Yıldırım ve ark. [8]'nin farklı yaşlara sahip sığırlarda süt pH değerleri arasında farklılık görülmediğini bildiren çalışmaları araştırma sonuçlarımızı destekler mahiyettedir.

Çizelge 4. Aralık ayı için haftalık pH analizi

Aralık	3-7 yaş grubu		7 yaş üstü grup	
1. Hafta	6,8171 ± 0,087	ÖS	6,7075 ± 0,072	
2. Hafta	6,6965 ± 0,035	ÖS	6,7363 ± 0,044	
3. Hafta	6,6434 ± 0,034	ÖS	6,6643 ± 0,052	

ÖS Önemsiz (p>0,05)

4. Sonuçlar

Araştırma sonuçlarına bakıldığında yaş grupları arasında süt biyokimyasal parametrelerinin benzer olduğu görülmüştür. Dolayısı ile ana yaşı farklılığının süt sığırlarında süt biyokimyasal parametreleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı söylenebilir. Ancak konu ile ilgili kesin yargılara varabilmek için yapılan bu çalışmaya benzer şekilde farklı sığır ırkları üzerinde yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- [1] Kominakis, A.P, Papavasiliou, D., Rogdakis, E., Relationships among udder characteristics, milk and non-yield traits in Frizarta dairy sheep. Small Rum. Res. 84/(1/3):82-88. 2009.
- [2] Filik, G., Görgülü, M. ve Boğa M., Farklı Mevsimlerde Siyah Alaca Süt İneklerinin Sabah Akşam Süt Kompozisyonunun Değişimi. Uluslararası Katılımlı I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı. Eskişehir. 2011.
- [3] Cimen, M., The Milk Biochemical Parameters and Sucking Behavior of Lambs until 35 D of Age. Asian Journal of Chemistry, 19(4): 3152-3156. 2007.
- [4] Cimen, M., Karaalp, M. and Elmastas, M., Effect of Breed and Live Weight on Milk Fat Depression in Sheep. Asian Journal of Chemistry, 20(5): 3885-3888. 2008.
- [5] Anonim, 2014. Devlet Destekli Tarım Sigortaları Sonuçları (2006-2013). Tarsim Tarım Sigortaları Havuzu. Sayfa:1-40.
- [6] Çimen, M., Fen ve Sağlık Bilimleri Alanlarında Spss Uygulamalı Veri Analizi. Palme Yayıncılık, Yayın No: 905, ISBN: 978-605-355-366-3. Sıhhiye, Ankara. 2015.
- [7] Norusis, M.J., SPSS for Windows: Base System User's Guide. SPSS, Chicago. 1993.
- [8] Yıldırım, S., Cimen, M., Cetin, M. and Dilmac, M., The Effect of Live Weight and Age of Dam on Milk

Biochemistry of Machine Milked Cows. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(2): 477-479. 2009.

- [9] Koneko, J.J. and Cornelius, C.E., Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 3rd Ed. AcademicPress, New York, pp: 41-376. 1980.



Kurşun uygulanan ratlarda lipit peroksidasyon üzerine çörek otu tohumunun antioksidan etkileri*

Osman Güler¹, Halil Şimşek**², Mehtap Özçelik³, Fulya Benzer⁴, İzzet Karahan⁵, Sezay Kaplan⁶

*Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenen TAGEM/GY/07/03/01/123 nolu projeden özetlenmiştir.

Özet

Bu çalışmada kurşun (Pb) verilen ratlarda kanda GSH-Px, katalaz aktiviteleri ile MDA, GSH, E vitamini, A vitamini ve β -karoten düzeylerine çörek otu tohumunun verilmesi ile oluşacak değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 40 adet (4 grup (n=10)) rat kullanıldı. 1. Grup kontrol grubu, 2. Grup Kurşun, 3. Grup Kurşun + % 2 çörek otu tohumu ve 4. Grup Kurşun + % 5 çörek otu tohumu şeklinde düzenlendi. Uygulama 6 hafta sürdü. Uygulama sonrası eritrositte MDA, GSH düzeyi ve GSH-Px, katalaz aktiviteleri ile plazma E vitamini, A vitamini ve β -Karoten düzeyleri ölçüldü. Kontrol grubuna kıyasla kurşun grubunda MDA düzeyi yüksek; GSH, katalaz ve vitamini E düzeylerinin düşük olduğu gözlemlendi. Kurşun + % 2 çörek otu tohumu verilen grup ile kurşun verilen grubu kıyasladığımızda MDA düzeyinin önemli ölçüde düşük olduğu, kurşun + % 5 çörek otu tohumu verilen grup ile kurşun verilen grubu kıyasladığımızda MDA düzeyinin düşük; GSH, vitamin E düzeyi ile katalaz aktivitesinin yüksek olduğu belirlendi. Vitamin A, β -Karoten ve GSH-Px düzeylerinde tüm guruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu tohumu; kurşun; MDA; antioksidan; rat

Antioxidant effect of nigella sativa seed on lipid peroxidation in lead administered rats

Abstract

The aim of this study is to determine the effects of orally administered Nigella Sativa seed on MDA, GSH, GSH-Px, CAT, vitamin A, vitamin E and β -carotene in lead exposed rats. In this study forty adult rats were used. The rats were randomly divided into four groups and treated as follows: Group 1: Control; Group 2: Pb administered; Group 3: Pb + 2% Nigella sativa seed; Group 4: Lead + 5% Nigella sativa seed. The study was lasted for 6 weeks. At the end of the study, blood samples collected and determined levels of MDA, GSH, vitamin A, vitamin E and β -carotene and activities of GSH-Px, CAT. MDA levels were found to be higher and GSH, CAT and vitamin E levels were found to be lower in Pb treated group than control group. MDA levels were found to be significantly lower Pb + 2% Nigella sativa seeds group compared with Pb treated group. MDA levels were found to be lower and GSH, CAT and vitamin E levels were found to be higher in Pb + 5% Nigella sativa seeds group when compared to Pb treated group. GSH-Px activity and vitamin A and β -carotene levels were found no significant difference in among all groups.

Keywords: Nigella sativa seed; lead; lipid peroxidation; antioxidation; rat

1. Giriş

Kurşun canlı organizma için toksik düzeyi yüksek olan bir metaldir. Günümüzde endüstri alanında yaygın şekilde kullanılan özellikle petrol, boya, pil, elektronik, takı ve

oyuncak sanayisinde kullanılmakta ve bunun sonucu olarak yaşadığımız ortamı tehdit eden ağır metal kirlenmenin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [1,2]. İnsan beslenmesinde kullanılan konserve gıdaların saklanması, içme suları ve motorlu araçlar tarafından eksoz dumanı ile dışarı atılması ve bunun canlılar tarafından solunmasına bağlı olarak gerek hayvanlar ve gerekse insanlarda olumsuz yönde etkisi bulunmaktadır [3]. Pb'un, insan ve hayvanlarda güçlü bir neurotoksik etkiye sahip olduğu [4] ve özellikle yeni doğanlarda zihinsel ve psikomotor gelişim üzerine olumsuz etkilerinin bulunduğu [5], hücre zarı, mitokondri,

¹Tunceli Üniversitesi, Pertek Meslek Yüksekokulu, Tunceli, Türkiye

²Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl, Türkiye

³Fırat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Elazığ, Türkiye

⁴Tunceli Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Tunceli, Türkiye

⁵Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ, Türkiye

⁶Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ, Türkiye

**Sorumlu yazar E-posta: hsimsek@bingol.edu.tr

çekirdek zarı ve DNA üzerine olumsuz etki yaptığı [6], hücrede bulunan zarlarda lipidlerin oksidasyonuna yol açtığı, geçirgenliğini ve yapısını bozduğu [7], düşük dozlarda hemoglobin sentezini azalttığı yüksek dozlarda anemiye yol açtığı bildirilmiştir [8]. Canlı organizmada bu tür fizyolojik ve biyokimyasal bozukluklar yanında karaciğer, böbrek, beyin gibi birçok organ ve dokuda oksidatif hasar meydana getirdiği belirtilmektedir [9].

Dokularda meydana gelen oksidatif hasara karşı duran bazı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan mekanizmalar bulunmaktadır. Bu antioksidan enzim mekanizmalarının başlıcaları, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir [10]. Non enzimatik mekanizmalardan önemli olanlarından biriside glutatyon (GSH) dur. GSH, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit radikali (CO₂⁻) ile doğrudan etkileşime girerek hücreleri serbest radikallerin oksidatif etkisine karşı korumaktadır [11].

Çörek otu tohumu (ÇOT) Akdeniz'den Uzakdoğu'ya kadar uzanan bir coğrafyada binlerce yıldan beri üretilmekte ve tüketilmekte olup birçok hastalıkta da tedavi amacıyla geleneksel tıpta kullanılmaktadır [12]. Özellikle yangı önleyici [13], ağrı kesici, immun sistemi aktive edici, antihistaminik etkileri olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [14,15]. Bunun yanında ÇOT'nun antibakteriyel ve antioksidan etkinliğini yüksek olduğu [16], insanlarda iştah açıcı, süt artırıcı, bayanlarda adet düzensizliklerini giderici, sindirim sisteminde gaz giderici ve idrar söktürücü olarak yaygın şekilde kullanıldığı belirtilmektedir [17].

Bu araştırmada, ratlarda Pb'un oluşturduğu hasar üzerine ÇOT'nun kanda lipid peroksidasyon ve bazı antioksidan değerlerde meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi amaçlandı.

2. Materyal ve metot

2.1. Hayvan materyali

Bu araştırmada canlı ağırlığı 200-230 gr olan 15 haftalık 40 adet Wistar Albino dişi rat kullanıldı. Hayvanlar 15 günlük adaptasyon döneminin ardından her grupta 10'ar adet olmak üzere 4 grup oluşturuldu. 1. Grup: Kontrol; içme suyu + pelet yem verildi. 2. Grup: % 0,2 Pb asetatlı içme suyu + pelet yem verildi. 3. Grup: % 0,2 Pb asetatlı içme suyu + % 2 ÇOT ilaveli pelet yem verildi. 4. Grup: % 0,2 Pb asetatlı içme suyu + % 5 ÇOT ilaveli pelet yem verildi. Uygulama 6 hafta sürdü, ratlara yem ve içme suyunda kurşun asetat ad-libitum olarak verildi.

2.2. Yem materyali

Araştırmada, Elazığ Yem Fabrikasından sağlanan rat yemi kullanıldı (Çizelge 1). ÇOT ilaveli yemler, aynı fabrikadan alınan yemlere peletleme öncesi % 2 ve % 5 olacak şekilde ÇOT ilave edilerek hazırlandı (Çizelge 2 ve Çizelge 3).

Araştırmada deneysel uygulamalar, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve 24±3°C) uygun olarak yürütüldü. Araştırma Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Etik Kurulu'ndan (Karar No:24.10.2008/6) alınan onaya göre Yerel Etik Kurulu ilkelerine uyularak yapıldı.

2.3. Kan örneklerinin alınması

Uygulama sonrası ratlar 12 saatlik açlığı takiben eter anestezisi altında, kalpten punksiyon yapılarak EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, (+4) C°de ve 1500 g'de 10 dakika santrifüj

edildikten sonra plazma ependorf tüplere alındı ve analizler yapılmaya kadar (-30)°C'de derin dondurucuda saklandı. Eritrosit paketleri ependorf tüplerde analiz edilinceye kadar (-30) °C'de derin dondurucuda saklandı ve analiz için 1/9 oranında distile su ile hazırlanan hemolizat kullanıldı.

Çizelge 1. Rat yemi bileşimi (Normal)

Yem Maddeleri	(%)
Buğday	30
Mısır	15
Arpa	10
Kepek (Buğday)	5
Soya Küspesi	30
Balık Unu	6,5
Limestone (Mermer Tozu)	2
Tuz	1
Methionin	0,25
*Vitamin ve Mineral Karışımı	0,25

*Vitamin A, D₃, K₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂ ve C, nicotinamide, folic acid, d-biotin, choline chloride, mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt ve selenyum.

Çizelge 2. Rat yem bileşimi (% 2 ÇOT)

Yem Maddeleri	(%)
Buğday	29,4
Mısır	14,7
Arpa	9,8
Kepek(Buğday)	4,9
Soya Küspesi	29,4
Balık Unu	6,37
Çörek Otu Tohumu	2
Limestone (Mermer Tozu)	1,98
Tuz	0,95
Methionin	0,245
*Vitamin ve Mineral Karışımı	0,245

*Vitamin A, D₃, K₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂ ve C, nicotinamide, folic acid, d-biotin, choline chloride, mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt ve selenyum.

Çizelge 3. Rat yem bileşimi (% 5 ÇOT)

Yem Maddeleri	(%)
Buğday	28,5
Mısır	14,25
Arpa	9,5
Kepek (Buğday)	4,75
Soya Küspesi	28,5
Balık Unu	6,175
Çörek Otu Tohumu	5
Limestone (Mermer Tozu)	1,9
Tuz	0,95
Methionin	0,2375
*Vitamin ve Mineral Karışımı	0,2375

*Vitamin A, D₃, K₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂ ve C, nicotinamide, folic acid, d-biotin, choline chloride, mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt ve selenyum.

2.4. Plazma vitamin E, vitamin A ve β-karoten tayini

Plazmada E vitamini, Kayden ve ark. [18]'nin metoduna göre (Shimadzu UV-120-01 Spektrofotometer Japan) spektrofotometresi ile ölçüldü. Plazma A vitamini ve β-karoten düzeylerinin belirlenmesi Suzuki ve Katoh [19]'un tanımladığı spektrofotometrik yöntem ile tespit edildi.

2.5. Eritrosit GSH-Px, GSH, katalaz ve lipid peroksidasyon tayini

Eritrosit GSH-Px aktivitesi düzeyi, Lawrence ve Burk [20]'un tarif ettiği şekilde ölçüldü. Eritrosit GSH düzeyi,

Sedlak ve Lindsay [21] tarif ettiği şekilde belirlendi. Eritrosit CAT enzimi tayini, Aebi [22]'nin tarif ettiği şekilde yapıldı. Eritrosit lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehid (MDA) Matkovic ve ark. [23]'nin tarafından modifiye edilen Placer ve ark. [24]'nin yöntemine göre spektrofotometre ile ölçüldü.

2.6. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Eritrosit protein konsantrasyonu, Gornal ve ark. [25]'nin tarif ettiği şekilde biüret yöntemi ile saptandı.

2.7. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılığın önemi tek yönlü ANOVA ile grup içindeki farklılıkların derecesi Duncan testi ile analiz edildi. Veriler; ortalama \pm standart hata olarak gösterildi [26].

3. Bulgular ve tartışma

Yapılan bu çalışmada eritrosit MDA, GSH, GSH-Px ve CAT konsantrasyonları Çizelge 4'de, plazma vitamin E, vitamin A ve β -karoten düzeyleri Çizelge 5'de verildi.

Pb tarafından oluşturulan oksidatif hasarın mekanizması arasında reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonu sonucu hücrelerde bulunan ve sülfidril grubu taşıyan antioksidan savunma sistemlerinin azalması başta gelmektedir [8]. Ayrıca Pb'un eritrositlerin membran yapısı ve fonksiyonları üzerine oksidatif etkileri bulunmaktadır. Pb bu etkisini eritrosit membranlarında ozmotik mekanik geçirgenliği artırmak sureti ile hücrede proteinlerin kompozisyonunda ve membrana bağlı olan enzimlerin aktivite düzeylerinde değişikliklere neden olmaktadır [27,28].

Güner ve ark. [29], ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada Pb verilen gurubun eritrosit MDA düzeyinde önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan MDA dokulardaki oksidatif hasarın bir göstergesidir. Caylak ve ark. [30], yaptıkları bir çalışmada ratlara oral yolla 5 hafta boyunca 2000 ppm düzeyde Pb asetat vermişler ve serumda MDA düzeyinde önemli düzeyde artma, vitamin E seviyesinde önemli ölçüde azalma, vitamin A seviyesi ve GSH-Px aktivitesinde ise istatistiksel anlamda bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir. Sivaprasad ve ark. [31], yaptıkları çalışmada içme suyu içerisinde Pb verdikleri sıçanlarda karaciğer doku örneklerinde MDA düzeyinde önemli bir artış olduğunu belirlemişlerdir. Patra ve ark. [32], yaptıkları çalışmada ağız yoluyla Pb asetat uygulanan sıçanlarda

eritrosit MDA düzeyinde önemli ölçüde yükselme, buna karşın CAT ve SOD aktivitesinde azalma olduğunu saptamışlardır. Erdoğan ve ark. [33], yem içerisinde Pb verdikleri tavuklarda kan MDA düzeyinin önemli miktarda yükseldiğini tespit etmişlerdir. Güzer ve ark. [34], ağız yoluyla Pb uyguladıkları sıçanlarda eritrosit MDA düzeyinin önemli ölçüde yükseldiğini, GSH miktarının azaldığını ve bununda oksidatif stresin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir Yapmış olduğumuz bu çalışmada Pb uygulanan sıçanlarda eritrosit MDA seviyesinin kontrol gurubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmüştür. MDA seviyesindeki bu artış Pb'un eritrositlerde lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir.

Hosseinzadeh ve ark. [35], sıçanların beyinlerinde iskemik perfüzyonla oluşturdukları hasarda lipid peroksidasyonda artış gösteren MDA düzeyinin ÇOT yağı verilen sıçanlarda önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Develi ve ark. [36], ratlarda yaptıkları bir çalışmada etanol ile oluşturulan oksidatif stres bağlı plazma MDA düzeyinde artış GSH seviyesinde azalma gözlerlerken vitamin E ve vitamin C düzeylerinde değişimin olmadığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar oksidatif hasarı korumak için ÇOT yağının kullanılması sonrası MDA düzeyinde önemli düzeyde azalma olduğunu gözlemişlerdir. Şahin ve ark. [37], CCl₄ ile deneysel karaciğer nekrozu oluşturdukları sıçanlarda yükselmiş bulunan kan MDA düzeyinin, yemlerine % 10 ÇOT ilave edilen sıçanlarda önemli ölçüde düştüğünü saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ÇOT ilaveli yem verilen tüm gruplarda MDA düzeyinin Pb verilen gruptan önemli ölçüde düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar çörek otu tohumu verilen grupta lipid peroksidasyonunun ve oksidatif hasarın Pb verilen gruptaki kadar ilerlemediğini göstermektedir.

Newairy ve ark. [38], içme suyu içinde Pb verdikleri sıçanlarda GSH düzeyi ve CAT aktivitesinde önemli düzeyde düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Flora ve ark. [39], yaptıkları çalışmada kronik kurşun zehirlenmesine maruz bırakılan sıçanlarda kan GSH düzeyi ve CAT aktivitesinde önemli bir düşüşün, GSH-Px aktivitesinde ise yükselişin olduğunu bildirmişlerdir. Chiba ve ark. [40], Pb'a maruz kalmış işçiler üzerinde yaptıkları çalışmada CAT aktivitesinin düşük olduğunu GSH-Px aktivitesinde bir fark olmadığını gözlemişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada Pb uygulanan sıçanların eritrosit GSH düzeyi ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı, GSH-Px aktivitesindeki azalmanın ise istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edildi. Antioksidanlarda meydana gelen bu azalma Pb'un eritrositlerde oksidatif hasara neden olduğunu ve bu hasarı önlemede vücudun daha çok GSH ve CAT enzimini kullandığını göstermektedir.

Çizelge 4. Eritrosit MDA, GSH, GSH-Px ve Katalaz düzeyleri

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (nmol/ml)	GSHPx (U/g prt)	CAT (k/g Hb)
Kontrol	15,160 \pm 0,513 ^c	0,089 \pm 0,006 ^d	100,507 \pm 7,044	1,371 \pm 0,173 ^d
% 0,2 Pb	19,916 \pm 0,469 ^a	0,066 \pm 0,003 ^f	86,703 \pm 4,814	0,896 \pm 0,065 ^f
% 0,2 Pb+% 2 ÇOT	18,009 \pm 0,819 ^b	0,073 \pm 0,004 ^{ef}	87,918 \pm 5,247	0,933 \pm 0,324 ^{ef}
% 0,2 Pb+% 5 ÇOT	16,107 \pm 0,687 ^c	0,081 \pm 0,003 ^{de}	91,301 \pm 6,107	1,293 \pm 0,142 ^{de}

Ortalama \pm SH; (a,b,c) p<0,01, (d,e,f) p<0,05 (n=10), aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir.

Çizelge 5. Plazma E Vitamini, A vitamini ve β -Karoten düzeyleri

Gruplar	Vitamin E (mmol/l)	Vitamin A (mmol/l)	β -Karoten (mmol/l)
Kontrol	17,393 \pm 0,868 ^a	0,714 \pm 0,066	0,084 \pm 0,006
% 0,2 Pb	13,086 \pm 1,150 ^b	0,661 \pm 0,060	0,073 \pm 0,007
% 0,2 Pb+% 2 ÇOT	14,727 \pm 1,027 ^{ab}	0,662 \pm 0,063	0,075 \pm 0,007
% 0,2 Pb+% 5 ÇOT	16,870 \pm 0,695 ^a	0,674 \pm 0,058	0,077 \pm 0,006

Ortalama \pm SH; (a,b) p<0,05, (n=10), aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir.

Sayed-Ahmed ve ark. [41], sıçanlarda gentamisine oluşturdukları akut renal toksisitede kan CAT aktivitesinin ve GSH düzeyinin önemli ölçüde düştüğünü, ÇOT'nun etkin maddesi olan timokuinon verilen sıçanlarda ise anlamlı ölçüde yükselme olduğunu saptamışlardır. Desai ve ark. [42], ratlarda streptozotisin ile oluşturdukları diyabet sonrası kan MDA düzeyinde artışın ve SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre azalmanın önemli düzeyde olduğunu tespit etmişler. Aynı araştırmacılar ÇOT verilen grupta diyabet grubuna kıyasla MDA düzeyindeki azalmanın ve SOD aktivitesindeki artışın önemli olduğunu bildirmişlerdir. Orhon ve ark. [43], ratlarda gamma ışınları ile barsaklarda oluşturdukları oksidatif hasara karşı ÇOT'nun antioksidan etkisini araştırmışlar. Radyasyon uygulaması sonrası doku MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla arttığını ve GSH-Px ve SOD enzim aktivitelerinin azaldığını tespit edilmişler. ÇOT kullanılan grupta radyasyon grubuna kıyasla MDA düzeyinde azalma ve GSH-Px ve SOD aktivitesi düzeylerinde ise artış olduğunu saptamışlardır. Kanter ve ark. [44], streptozotisin ile oluşturdukları diabetik sıçanlarda düşmüş bulunan CAT, GSH-Px ve SOD enzim aktivitelerinin ÇOT yağı verilenlerde yükseldiğini bildirmişlerdir. Araştırmamızda % 5 ÇOT ilaveli yem verilen grupta eritrosit GSH düzeyi ve CAT aktivitesinin önemli oranda arttığı, % 2 ÇOT ilaveli yem verilen grupta değişimin önemli olmadığı görülmüştür.

Çalışmada plazma vitamin E düzeyinde Pb uygulanan grupta bir düşüşün olduğu, vitamin A ve β -Karoten düzeylerinde ise tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılığın olmadığı tespit edildi. Pb verilen gruba kıyasla % 5 ÇOT ilaveli yem verilen grup vitamin E düzeyindeki yüksekliğin istatistiksel açıdan önemli olduğu, buna karşın % 2 ÇOT ilaveli yem verilen gruptaki yüksekliğin önemli olmadığı belirlendi. Vitamin E düzeyindeki bu artışın ÇOT içerdiği tokoferoldan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4. Sonuçlar

Bu çalışmada, Pb uygulamasının oksidatif hasara yol açtığı ve buna bağlı olarak ratlarda kan lipit peroksidasyon düzeyini artırdığı ayrıca enzimatik ve enzimatik olmayan bazı antioksidan düzeylerini azalttığı saptandı. Oluşan bu hasara karşı ÇOT uygulamasının lipit peroksidasyon düzeyini azaltırken bazı antioksidan parametreleri artırdığı tespit edildi. Böylelikle ÇOT'nun, Pb ve diğer metallerin canlı organizmada toksik etkenlerin oluşturabileceği oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılmasının bazı antioksidanların aktivitelerinde artışa yönelik olumlu etkilerinin olduğu düşünülmekte ve kullanılması önerilmektedir.

Kaynaklar

- [1] Meyer PA., Brown MJ., Falk H., Global approach to reducing lead exposure and poisoning. *Mutation Research.*, 659, 166-175, 2008.
- [2] Altıncı Beş Yıllık Kalkınma Planı Demir Dışı Metaller Özel İhtisas Komisyonu. Kurşun, Çinko, Kurşun ve Kadmiyum Raporu. TC Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Yayın No: DPT: 2318-ÖİK: 419, 39-40, Ankara, 1992.
- [3] World Health Organisation (WHO). *Environmental Health Criteria 165-Inorganic Lead*. Geneva, 1995
- [4] Bressler J., Kim KA., Chakraborti T., Goldstein G., Mechanism of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, 24, 595-600, 1999.

- [5] Lanphear BP., Hornung R., Khoury J., Yolton K. Baghurst P., Bellinger DC., Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ. Health Perspect.*, 113, 894-899, 2005.
- [6] Bellinger DC., Teratogen update: lead and pregnancy. *Birth Defects Res.*, 73, 409-420, 2005.
- [7] Adonaylo VN., Oteiza PI., Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology*, 132, 19-32, 1999a.
- [8] Gurer H., Ercal N., Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 927-945, 2000.
- [9] Adonaylo VN., Oteiza PI., Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*, 135, 77-85, 1999b
- [10] Dobashi K., Ghosh B., Orak JK., Singh I., Sing AK., Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol. Cell. Biochem.*, 205, 1-11, 2000.
- [11] Meister A., Anderson ME., Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711-760, 1983.
- [12] Al-Ghamdi MS., The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J. Ethnopharma.*, 76, 45-48, 2001.
- [13] El Gazzar M., El Mezayen R., Marecki JC., Nicolls MR., Canastar A., Dreskin SC., Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int. Immunopharmacol.*, 6, 1135-1142, 2006.
- [14] Ghosheh ÖA., Houdi AA., Crooks PA., High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacological active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.) *J. of Pharm. and Biochem. Anal.*, 19, 757-762, 1999.
- [15] Ali BH., Blunden G., Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.*, 17, 299-305, 2003.
- [16] Salem ML., Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int. Immunopharmacol.*, 5 (13-14), 1749-1770, 2005.
- [17] Baydar H., Tıbbi aromatik ve keyf bitkileri bilim ve teknolojisi. Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak., Yayın No:51, 157-159, Isparta, 2005.
- [18] Kayden HJ., Chow CK., Bjarnson LK., Spectrophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. *J. Lip. Res.*, 14, 533-540, 1973.
- [19] Suzuki J., Katoh N., A Simple and cheap methods for measuring serum vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn. Vet. Sc.*, 52 (6), 1282-1284, 1990.
- [20] Lawrence RA., Burk RF., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 71 (4), 952-958, 1976.
- [21] Sedlak J., Lindsay RHC., Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-205, 1968.

- [22] Aebi H., Catalase. In vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126, 1984.
- [23] Matkovics B., Szabo I., Varga IS., Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways (in Hungarian). *Lab. Diag.*, 15, 248-249, 1988.
- [24] Placer ZA., Cushmann LL., Johnson BC., Estimation of products of lipid peroxidation in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16, 359-364, 1966.
- [25] Gornal AG., Bardawill CJ., David MM., Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751, 1975.
- [26] Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V., Biyoistatistik Özdemir Basım Yayım ve Dağıtım LTD. Şti. 6. Baskı, ANKARA, 1995.
- [27] Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N., Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1 (6), 529-539, 2001.
- [28] Levander OA., Morris VC., Ferretti RJ., Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient lead-poisoned rats. *J. Nutr.*, 107 (3), 363-372, 1977.
- [29] Gurer, H., Ozgunes, H. Oztezcan, S. and Ercal, N. Antioxidant role of α -lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol Med.* 26, 75-81, 1999.
- [30] Caylak E., Aytekin M., Halifeoglu I., Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60.(4-5), 289-94, 2008.
- [31] Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P., Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver, *J. Nutr. Biochem.*, 15, 18-23, 2004.
- [32] Patra RC., Swarup D., Effect of lead on erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxide level and thiol groups in calves. *Res. Vet. Sci.*, 68, 71-74, 2000.
- [33] Erdoğan Z., Erdoğan S., Aksu T., Baytok E., The effects of dietary lead exposure and ascorbic acid on performance, lipid peroxidation status and biochemical parameters of broilers. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29, 1053-1059, 2005.
- [34] Gurer H., Ozgunes H., Neal R., Spitz DR., Ercal N., Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology.*, 128, 181-189, 1998.
- [35] Hosseinzadeh H., Parvardeh S., Asl MN., Sadeghnia HR., Ziaee T., Effect of thymoquinone and Nigella sativa seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine*, 14, 621-627, 2007.
- [36] Develi S., Evran B., Kalaz EB., Koçak-Toker N., Özdemirler-Erata G., Protective effect of Nigella sativa oil against binge ethanol-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Chin. J. Nat. Med.*, 12 (7), 0495-0499, 2014.
- [37] Şahin A., Yener Z., Dağoğlu G., Dede S., Oto G., Alkan M., Karbontetraklorid (CCI) ile deneysel olarak karaciğer nekrozu oluşturulan ratlarda vitamin E+selenyum ve nigella sativa (Çörekotu)'nun karaciğer yıkımını engelleyici etkileri. *Türk. J. Vet. Anim.Sci.*, 27, 141-152, 2003.
- [38] Newairy ASA., Abdou HM., Protective role of flax lignans against lead acetate induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. *Food and Chem. Toxicol.*, 47 (4), 813-818, 2009.
- [39] Flora SJS., Pande M., Mehta A., Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chemico-Biological Interac.*, 145, 267-280, 2003.
- [40] Chiba M., Shinohara A., Matsushita K., Watanabe H., Inaba Y., Indices of lead exposure in blood and urine of lead exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *Tohoku. J. Exp. Med.*, 178 (1), 49-62, 1996.
- [41] Sayed-Ahmed MM., Nagi MN., Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.*, 34 (5-6), 399-405, 2007.
- [42] Desai SD., Shaik HS., Kusal KD., Haseena S., Effect of Nigella sativa seed powder on MDA and SOD levels in Streptozotocine induced diabetes Albino Rats. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 7 (4), 206-209, 2015.
- [43] Orhon ZN., Uzal C., Kanter MM., Erboğa M., Demiroğlu M., Protective effects of Nigella sativa on gamma radiation-induced jejunal mucosal damage in rats. *Pathology-Research and Practice*, 212, 437-443, 2016.
- [44] Kanter M., Coskun O., Korkmaz A., Oter S., Effects of Nigella sativa on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 279 (1), 685-91, 2004.