

## *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey bitkisinin ve kallus doku kültürünün antioksidan aktivitesi

Serap ŞAHİN BAŞAK\*, Ferda CANDAN

C.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı, 58140, Sivas

### Özet

*Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey Azerbeycan, Ermenistan, İran ve Türkiye'yi kapsayan geniş bir coğrafyada yetişmektedir. Çalışmamızda, *Lallemantia canescens* ve aynı bitkinin *in vitro* kallus kültürünün hem taze hem de metanol özütlerinin kararlı bir radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ile reaktif oksijen türleri olan hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) radikalleri ve lipid peroksidasyon inhibisyon özellikleri çalışılarak, antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Deneylerde standart olarak bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır. *Lallemantia canescens* ile *in vitro* kallus kültürünün metanol özütlerinin toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam antioksidan aktivitelerinin nicel olarak belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır. Özütlerin toplam fenol içerikleri Folin-Ciocalteu belirteciyle, toplam flavonoid miktarları aliminyum klorür metoduyla ve toplam antioksidan aktiviteleri ise fosfomolibden yöntemi ile tayin edilmiştir. Tüm *Lallemantia canescens* örneklerinin, kararlı bir radikal olan DPPH ile,  $\text{Fe}^3$ -askorbat-EDTA –  $\text{H}_2\text{O}_2$  sistemi ile oluşturulan hidroksil radikalini ( $\cdot\text{OH}$ ) temizledikleri saptanmıştır. *Lallemantia canescens* ve kallus doku kültürü metanol özütlerinin, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit radikalini ( $\text{O}_2^-$ ) ve sıçan karaciğer homojenatında tiyobarbitirik asit reaktif substratları (TBARS)'nın oluşumu ile belirlenen lipid peroksidasyonunu da inhibe ettikleri bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, *Lallemantia canescens* ile *in vitro* kallus kültürünün hem taze hemde metanol özütlerinin radikalleri temizleyerek ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. *Lallemantia canescens* ve kallus doku kültürü metanol özütlerinin yüksek toplam flavonoid ve toplam fenol içerikleri nedeniyle, biyoaktif moleküller için iyi birer kaynak olabilecekleri gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Lallemantia canescens*, kallus kültürü, serbest radikal, antioksidan.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Serap ŞAHİN BAŞAK. wserap@yahoo.com; Tel: (346) 219 10 10 / 2143.

Bu makale, birinci yazar tarafından C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Programında tamamlanmış olan "*Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey bitkisinin ve kallus doku kültürünün antioksidan aktivitesi" adlı yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 09.09.2008 tarihinde dergiye ulaştırılmış, 03.11.2008 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.03.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## **Antioxidant activity of *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey and its callus tissue culture**

### **Extended abstract**

*Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey has spread out in wide location of Armenia, Azerbaijan, Iran and Turkey. The aim of the present work was to assay the antioxidant activities of fresh *Lallemantia canescens* and methanol extract, in addition in vitro callus tissue culture and callus tissue culture methanol extracts of *Lallemantia canescens*. BHT, curcumin and ascorbic acid was used as positive standards.

It was determined that all the *Lallemantia canescens* examples scavenge hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) generated by  $\text{Fe}^{3+}$ -ascorbate-EDTA- $\text{H}_2\text{O}_2$  system.

When the examples hydroxyl radical scavenging properties were examined based on  $\text{IC}_{50}$  which scavenging concentration %50 of the hydroxyl radical, it was found that decreases as plant methanol extract > fresh plant > callus tissue culture > callus tissue culture methanol extract respectively.

It was seen that all examples had lower hydroxyl radical scavenging properties than the curcumin being used as a positive control. Whereas the other positive control BHT was found to have a lower hydroxyl radical scavenging properties than the fresh plant and plant methanol extract, but a higher scavenging property than the callus tissue culture and callus tissue culture methanol extract. Because the ascorbic acid was in a experiment of hydroxyl radical environment, it was not used as a positive standard in hydroxyl radical scavenging inhibition

When the DPPH radicals reducing properties were examined based on the  $\text{IC}_{50}$  values it was found that all the *Lallemantia canescens* examples reduced the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); plant methanol extract > fresh plant > callus tissue culture methanol extract > callus tissue culture, respectively.

It was seen that the ascorbic acid which of the positive control, has a higher DPPH radical reducing activity than all the examples. Curcumin had a higher than all examples except plant methanol extract whereas BHT had a lower than all examples except for the callus tissue culture, DPPH radical reducing properties.

Plant methanol extract and callus tissue culture methanol extract have been found to both scavenged superoxide radicals ( $\text{O}_2^-$ ) generated by a xanthine and xanthine oxidase system and Fe(II) induced lipid peroxidation in rat liver homogenates, as indicated by decreased thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) formation. It was seen that the plant methanol extract was more active than the callus tissue culture methanol extract in superoxide radical scavenging and the lipid peroxidation inhibition.

When the results were compared to positive controls it was found that curcumin and BHT are more active in superoxide scavenging and lipid peroxidation inhibiting than the plant methanol extract and callus tissue culture methanol extract samples. Because the ascorbic acid was in a experiment lipid peroxidation environment, it was not used as a positive standard in lipid peroxidation inhibition but was found that its superoxide radical scavenging activity was lower than the other controls and extracts.

In addition, spectrophotometric assay for the quantitative determination of total antioxidant capacity, of plant methanol extract and callus tissue culture methanol extract was carried out. The extracts were analysed for the determination of total flavonoid by using the aluminium chloride method. Total phenol estimation was determined by the colorimetric method the Folin-Ciocaltes reagent.

It was found that total phenolic, total flavonoid and total antioxidant activity properties were higher in plant methanol extract than the callus tissue culture methanol extract.

Using these results it was determined that both fresh and methanol extracts of *Lallemantia canescens* in addition the in vitro callus tissue culture and callus tissue culture methanol extract has antioxidant activities by scavenging radicals and lipid peroxidation inhibition.

It was observed that the *Lallemantia canescens* and the callus tissue culture methanol extracts could be a good source for bioactive molecules because of the high flavanoid and phenol quantities.

**Keywords:** *Lallemantia canescens*, callus tissue culture free radical antioxidant.

## Giriş

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, organik veya inorganik moleküllerle tepkimeye girebilme yeteneğine sahip olan, yüksek oranda reaktif ve kısa ömürlü bileşiklerdir.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Aerob canlılar yaşamlarının devamı için oksijene gereksinim duyarlar. Canlılarda oksijenin tek değerlikli indirgenmesi ile önce süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), bunun dismutasyonu ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşur. Bu iki bileşik ortamdan hemen uzaklaştırılmazsa, hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) üretirler (Lunec, 1990).

Moleküler oksijenin toksik oluşunun nedeni oluşan bu oksijen radikalleridir. Bu reaktif oksijen türlerinin bazılarının in vivo sistemde enerji üretiminde, fagositozda, hücre içi sinyal iletiminde ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde veya biyolojik önemli bileşiklerin sentezinde pozitif rolleri bulunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Halliwell, 1994). Bununla birlikte reaktif oksijen türleri lipidlere, proteinlere, enzimlere, karbohidratlara ve DNA'ya saldırarak hasarlara neden olmaktadır (Dean vd., 1993; Cerutti, 1994; Diplock vd., 1994). Bu oksidatif hasarlar da, yaşlanma, kalp hastalığı, katarakt, diyabet ve kanser gibi bir çok hastalığa sebep olmaktadır (Block, 1992; Ames vd., 1993).

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ( $R^{\cdot}$ ), peroksil radikalleri ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoksil radikalleri ( $RO^{\cdot}$ ), tiyol radikalleri ( $RS^{\cdot}$ ) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelir. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitleri (PUFAH)'nden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri ise oksijenle tekrar tepkimeye girip sülfenil ( $RSO^{\cdot}$ ) veya tiyol peroksil ( $RSO_2^{\cdot}$ ) gibi radikalleri meydana getirirler (Brown, 1990; Akkuş, 1995; Gutteridge, 1995).

Reaktif oksijen türlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir. Antioksidanlar

doğal (endojen) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar veya enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Enzim kaynaklı antioksidanlara örnek olarak mitokondriyal sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve hidroperoksidaz sayılabilir. Enzim olmayanların başında lipid fazda yeralan  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini),  $\beta$ -karoten ile suda çözünenler; askorbik asit (C vitamini), melatonin, sistein, seruloplazmin, hemoglobin, bilirubin vb sayılabilir (Lee vd., 2001).

Çalışmada kullanılan *Lamiaceae* familyasına ait olan *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey bitkisi çok yıllık olup, Türkiye, İran, Ermenistan ve Azerbeycan'da yetişmektedir. *Lallemantia canescens*, canlı mavi renkli çiçeklere ve hoş bir kokuya sahiptir. Daha çok süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Çiçeklenme zamanı Haziran ve Ağustos aylarıdır. Yol ve tarla kenarlarında, kayalık alanlarda 1300-3200 m arasında bulunur.

*Lallemantia* türlerinden *L. iberica*, *L. roylena* ve *L. peltata*'nın yağ analizleri yapılmış (Baranyk, 1995; Baser vd., 2000; Ghannadi ve Zolfaghari, 2003), İranda yetişen *Lallemantia* türlerinde ise 14 farklı flavon ve iki farklı flavonol bulunmuştur (Jamzad, 2003).

Mikro çoğaltım teknikleri veya in vitro kültürler; diğer klasik üretim yöntemlerinden farklı olarak, bitkinin çeşitli kısımlarından alınan meristem, sürgün ucu, anter, embriyo gibi eksplantların sterilize edildikten sonra organik ve inorganik çeşitli maddeleri içeren steril gıda ortamlarında (in vitro ortamlarda) ve uygun çevre koşullarında kültüre alınması ve bu ortam içinde bu eksplantların bitkiciklere dönüştürme işlemidir. Bu yöntemle; kısa sürede sağlıklı ve çok sayıda bitki materyali elde edilmesi, gelecekteki yöntemlerle kolay çoğaltılamayan bitkilerin çoğaltılması, yıl boyu üretim yapılabilmesi, patojenlerden arı bitki elde edilmesi, ıslah amacıyla genotip farklılıklarının oluşturulması, arter ve polen kültürleriyle haploit bitkilerin üretilmesi seleksiyon kolaylığı, ıslah süresinin kısaltılması, yeni melezlerin hızlı bir şekilde

çoğaltılabilmesi ve bitki gen kaynaklarının muhafazası sağlanır (Hutchinson ve Zimmerhan, 1987).

Bu çalışmada, dünyada sadece Azerbeycan, İran ve Türkiye’de yetişen ve hiçbir bilimsel çalışma yapılmayan *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey bitkisinin ve kallus doku kültürü metanol özütlerinin toplam fenol ve flavonoid miktarının saptanması; metanol özütleriyle birlikte, bitkinin ve kallus doku kültürünün taze kısımlarında in vitro antioksidan ve serbest radikal temizleme özellikleri incelenerek *Lallemantia canescens* bitkisi ile kallus doku kültürünün antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve yöntem

### Bitkinin toplanması ve bitki materyalinin özütlenmesi

Çalışmada kullanılan *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey adlı bitki, Temmuz 2002 yılında, B6. Sivas; Ulaş, Tecer köprüsünün yanı, Sivas-Kangal yolu, 1400 m’de toplanmış ve Dr. Erol Dönmez tarafından tanımlanmıştır (3020 A.A.). Bitki örnekleri Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbarium Laboratuvarı’nda saklanmıştır.

Gölgede kurutulan ve toz haline getirilen 100g bitki örneği Soklet cihazında 60 °C’de 1L metanol ile 4 saat süresince özütlenmiştir. Özüt filtre edilerek vakum altında 45 °C’de kurutulmuştur. Elde edilen özüt 4 °C’de liyofilize edilerek karanlıkta saklanmıştır.

### Kallus doku kültürünün hazırlanması

*Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey.’ın olgunlaşmış tohumları %70 lik etanol çözeltisi ile 1 dakika, % 0.1 lik NaOCl çözeltisi ile 10 dakika sterilize edilmiş ve tohumların hepsi distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan tohumlar Gamborg’un B5 temel besi ortamına (2.0 ppm naftalen asetik asit (NAA), 2.0 ppm 6-benzil adenin (6-BA), 25 g/L sukroz ve 8.5 g/L agar ile desteklenmiş) transfer edilerek kallus doku kültürlerinin oluşumu başlatılmıştır. Oluşan kültürlerin 28 gün aralıklarla alt kültürleri yapılarak aydınlık ortamda ve 25 °C’de muhafaza edilmiş-

lerdir. Kültürlerinin başlatılmasından 3 ay sonra 28. gün sonunda periyodik olarak hasat etme işlemine başlanmıştır. Hasat edilen materyal fosfat tamponuyla (pH:7.4) homojenize edilmiştir. Homojenat 15000 g’de 15 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant deneysel aşamalarda kullanılmıştır.

### Toplam fenol içeriğinin ölçümü

*Lallemantia canescens*’in toplam fenol içeriğinin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu belirteci kullanılmıştır (Mc Donald vd., 2001). 0.5 mL seyreltilmiş örnek (1:10 v/v), 5 ml Folin-Ciocalteu belirteci (1:10 distile su ile seyreltilmiş) ve 4 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> karıştırılmıştır. Tepkime karışımı 45 °C’de 15 dakika ısıtılmıştır. Örneklerin absorbansları 765 nm dalga boyunda kontrol örneğe (0.5 mL fosfat tamponu, 5 mL Folin-Ciocalteu belirteci, 4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ) karşı okunmuştur. Standart eğrinin hazırlanması için metanol: su (50:50 v/v) içerisinde 0, 50, 100, 150, 200, 250 mg L<sup>-1</sup> derişimlerinde gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Toplam fenol içeriği aşağıdaki hesaplama sonucu, mg gallik asit g<sup>-1</sup> kuru kütle şeklinde verilmiştir.

$$C = \frac{c \times V}{m}$$

Burada: C – Toplam fenolik derişimi, mg g<sup>-1</sup>

c – Gallik asit derişimi, mg mL<sup>-1</sup>

V – Seyreltilmiş örnek hacmi, 150 µL

m – Uçucu yağın kütlesi, g

### Toplam flavanoid içeriğinin saptanması

*Lallemantia canescens*’in flavanoid içeriğinin saptanmasında metanolik form kullanılmıştır (Lamaison vd., 1990). Metanolde çözülmüş olan örnekten 1 mL ve 1mL % 2’lik AlCl<sub>3</sub> (metanolglasiyel asetik asit 1/1: v/v) çözeltisi karıştırılmıştır. Tepkime karışımı 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbansları 394 nm dalga boyunda kontrol örneğe (1 mL metanol, 1 ml % 2’lik AlCl<sub>3</sub>) karşı okunmuştur. Flavanoid derişimi kuersetin’in kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplan-

mıştır. Flavanoid miktarı, % kuersetin değeri ile verilmiştir.

### **Toplam antioksidan kapasitenin saptanması**

Yöntemin temeli asidik Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesiyle asidik pH'ta yeşil renkli fosfat/Mo (V) kompleksinin oluşmasına dayanmaktadır (Prieto vd., 1999). 0.2 mL örneklerin hazırlandığı çözelti (0.1 mg mL<sup>-1</sup> metanol) ve 2 mL belirteç çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) tüplere konularak ağızları kapatıldıktan sonra 37 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler buz banyosunda oda sıcaklığına soğutulmuş ve 695 nm dalga boyunda kontrol örneğe (0.2 ml metanol, 2 mL belirteç çözeltisi) karşı okunmuştur. Toplam antioksidan kapasite, mM α-tokoferol asetat g<sup>-1</sup> kuru kütle şeklinde verilmiştir.

### **Hidroksil radikalini temizleme özelliği**

Bu amaçla 3 mL'lik deney ortamına *Lallemantia canescens*'in farklı derişimlerdeki özütleri, 100 µL 3.0 mM deoksiriboz, 100 µL 0.1 mM FeCl<sub>3</sub>, 100 µL 0.1 mM EDTA, 100 µL 0.1 mM askorbik asit, 100 µL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 500 µL 20 mM fosfat tampon (pH 7.4) ilave edilmiştir. Tepkime karışımı 37 °C de 1 saat inkübe edilmiştir. 1 mL, %1'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ve 1 mL %2.8'lik trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dakika kaynatılmıştır. Açığa çıkan malondialdehitin, TBA ile oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm dalga boyundaki absorbansı kontrol örneğe (100 mL deoksiriboz, 2.9 mL fosfat tamponu) karşı okunarak % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır (Ohkawa vd., 1979; Kunchandy ve Rao, 1990).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri özüt derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek her bir özütün %50 inhibisyon (IC<sub>50</sub>) değeri hesaplanmıştır. Antioksidan besin katkı maddesi olarak kullanılan butillenmiş hidroksi toluen (BHT), ve antioksidan bir bitki bileşeni olan kurkumin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### **DPPH radikalini temizleme özelliği**

*Lallemantia canescens*'in ardışık seyreltme yöntemiyle hazırlanan farklı derişimlerdeki örnek çözeltileri ile DPPH'nin seyreltik metanol çözeltilisinin (% 0.004) 5 mL'si karıştırılarak 30 dakika inkübe edilmiş ve 517 nm dalga boyunda örneklerin absorbansı kontrol örneğe (5 mL metanol) karşı okunmuştur (Cuendet vd., 1997). Herbir özütün IC<sub>50</sub> değeri, hidroksil radikalini temizleme özelliğindeki gibi hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHT, kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır.

### **Süperoksit radikalini temizleme özelliği**

Bu amaçla 2 mL'lik deney ortamına *Lallemantia canescens*'in farklı derişimlerdeki özütleri ile 100 µM ksantin, 600 µM NBT, 0.05 U/mL ksantin oksidaz ve 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) karıştırılmıştır. 25 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 560 nm dalga boyunda absorbansları okunarak (Robak ve Gryglewski, 1988), her bir özütün IC<sub>50</sub> değeri hidroksil radikalini temizleme özelliğindeki gibi hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHT, kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır.

### **Lipid peroksit oluşumunun inhibisyonu**

Sıçan karaciğeri (25 % (w/v) ), 40 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.0) ile üç vuruşta homojenize edilmiştir. Homojenat 10.000g'de 10 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant deneysel çalışmalar için kullanılmıştır. 1.5 mL'lik deney ortamına farklı derişimlerde 0.5 mL *Lallemantia canescens*'in özütleri, 0.5 mL dökelti ile 0.16 mM FeSO<sub>4</sub> ve 0.1 mM askorbik asit ilave edilmiştir. Tepkime karışımı 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 mL, %1'lik TBA ve 1 mL %2.8'lik TCA eklenerek 100 °C'de 15 dakika kaynatılmış, açığa çıkan malondialdehitin, TBA ile oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm dalga boyundaki absorbansı kontrol örneğe karşı okunarak % inhibisyon değerleri, hidroksil radikalini temizleme metodundaki eşitlikten hesaplanmıştır (Ohkawa vd.,1979). Pozitif kontrol olarak BHT ve kurkumin kullanılmıştır.

### **İstatistiksel çalışmalar**

Araştırma kapsamında yapılan bütün deneysel çalışmalar üç tekrarlı yapıp, sonuçlar standart

sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Ayrıca tüm grafikler, Sigma Plot grafik ve istatistik programı kullanılarak çizilip 't' regrasyon testi uygulanmıştır. Anlamlılık için  $p < 0.01$  seçilmiştir.

## Deneysel çalışma sonuçları

### Kallus doku kültürü

Kallus üretiminde çeşitli besi ortamları kullanılmış ancak en iyi gelişme B2-B6 ortamında gözlenmiş olup, tüm çalışmalarda bu ortamda gelişen kalluslar kullanılmıştır. *Lallemantia canescens*'in metanol özütü ile kallus doku kültür metanol özütünün verimleri sırasıyla  $72.7 \pm 2$  ve  $29.3 \pm 4$  g  $kg^{-1}$  olarak bulunmuştur.

### *Lallemantia canescens*'e ait örneklerde toplam fenol, flavanoid miktarı ve toplam antioksidan kapasitesi

*Lallemantia canescens*'in metanol özütü ile kallus kültürünün metanol özütünün toplam flavanoid ve fenol miktarı ile toplam antioksidan kapasitesi Tablo 1'de sunulmuştur. Tablo 1'den de görüldüğü gibi özütlerde antioksidan kapasitesi ile toplam fenol, flavanoid miktarları arasında pozitif bir korelasyon gözlenmektedir. Bitki özütünün, kallus özütüne göre daha yüksek oranda toplam fenol, toplam flavanoid ve toplam antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

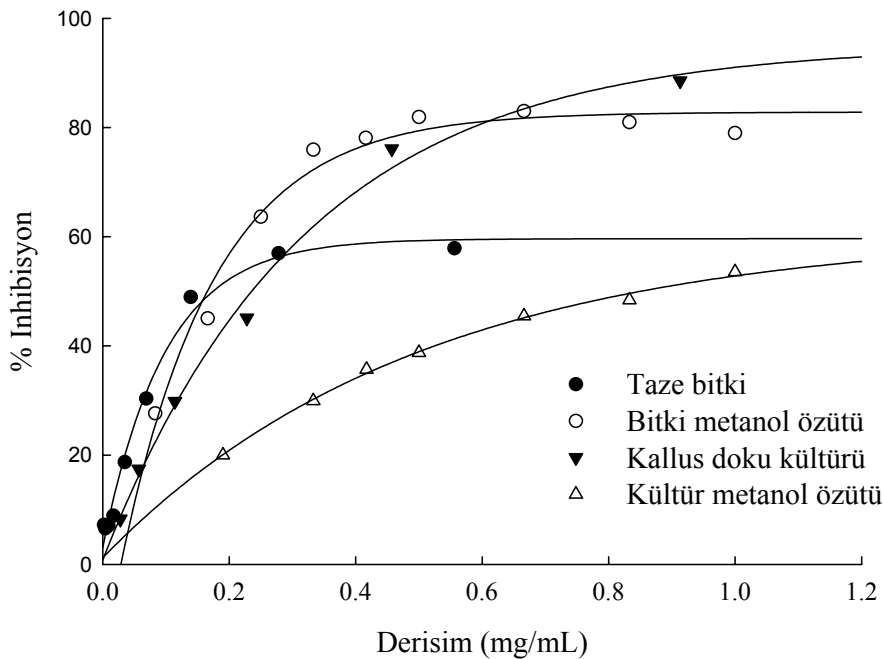
Tablo 1. *Lallemantia canescens*'in metanol özütü ile kallus kültürü metanol özütünün toplam flavanoid ve fenol miktarı ile toplam antioksidan kapasitesi

Özütler	Toplam flavanoid	Toplam fenol	Toplam antioksidan
Bitki	0.288±0.009	397.62±12.467	5.483±0.232
Kallus	0.252±0.012	325.00±17.505	4.615±0.283

### Hidroksil radikalini temizleme özelliği

*Lallemantia canescens*'in hidroksil radikalini temizleme özelliği,  $Fe^{3+}$ /askorbat/EDTA/ $H_2O_2$  sistemi (Kunchandy ve Rao, 1990) ile oluşturulan hidroksil radikallerinin deoksiribozu bozundurması ile meydana gelen tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin ölçümü ile belirlenmiştir (Ohkawa vd.,1979).

*Lallemantia canescens*'in ve kallus kültürünün metanol özütleri ile taze bitki ve doku kültürünün derişimlere karşı % inhibisyon grafikleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu grafiklerden yararlanılarak %50 inhibisyon sağlayan derişimler  $mg mL^{-1}$  olarak bulunmuştur. Aynı çalışma şartlarında pozitif kontrol BHT ve kurkumin içinde % 50inhibisyon sağlayan derişim değerleri bulunmuştur. Elde edilen bulgular Tablo 2'de sunulmuştur.



Şekil 1. OH radikalini inhibisyonunun örnek derişimleriyle değişimi

Tablo 2’de görüldüğü gibi bitkiye ait örneklerin, hidroksil radikalini temizleme özelliği sırasıyla bitki metanol özütü > taze bitki > kallus doku kültürü > kültür metanol özütü şeklindedir.

Tablo 2. *Lallemantia Canescens*’in örneklerinin ve pozitif kontrollerin, hidroksil radikalinin %50 inhibisyonunu sağlayan derişimleri

Örnek	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Taze bitki	176.5 ± 2.3
Bitki metanol özütü	161.0 ± 8.9
Kallus doku kültürü	241.0 ± 4.7
Kültür metanol özütü	867.0 ± 13.9
BHT	227.0 ± 12.4
Kurkumin	43.61 ± 3.9

### DPPH radikalini temizleme özelliği

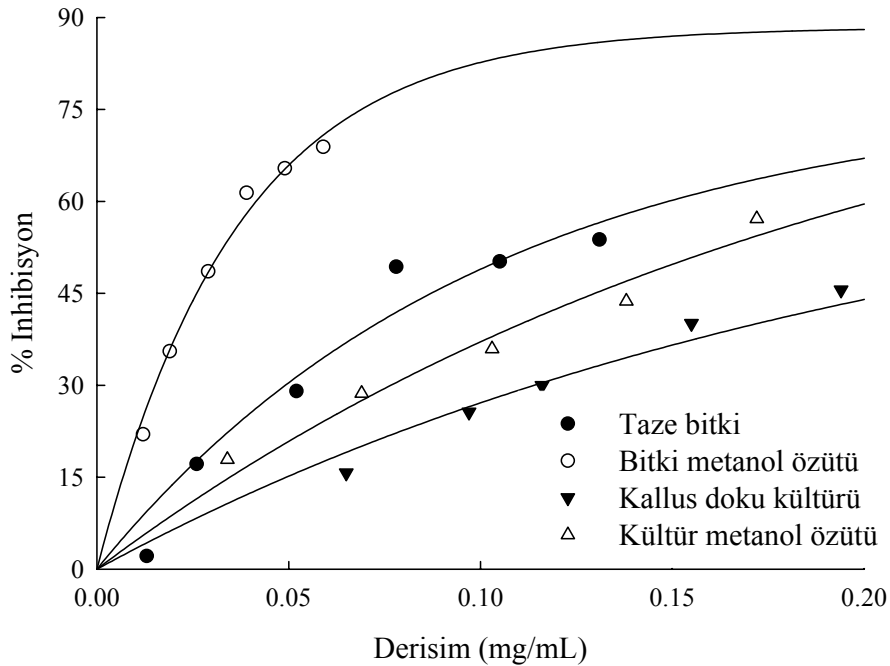
Bu test yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH.)’in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır (Cuendet vd., 1997).

Tüm özütlerin derişimlere karşı % inhibisyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 2). Bu grafiklerden yararlanılarak DPPH’in % 50 inhibisyonunu sağlayan derişimler mg mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Aynı çalışma şartlarında pozitif kontrol BHT, kurkumin ve askorbik asit içinde %50 inhibisyon sağlayan derişim değerleri bulunmuştur.

Elde edilen bulgular Tablo 3.’te sunulmuştur. Tablo 3’ten görüldüğü gibi DPPH radikalini en yüksek temizleme kapasitesi yine bitkini metanol özütünde gözlenmiştir.

Tablo 3. *Lallemantia Canescens*’in örneklerinin ve pozitif kontrollerin DPPH testinde %50 inhibisyon sağlayan derişimleri

Örnek	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Taze bitki	96.8 ± 1.4
Bitki metanol özütü	26.4 ± 0.3
Kallus doku kültürü	242.0 ± 3.7
Kültür metanol özütü	145.0 ± 1.2
BHT	193.1 ± 12.1
Kurkumin	42.80 ± 4.0
Askorbik asit	3.91 ± 0.10



Şekil 2. DPPH radikalini inhibisyonunun örnek derişimleriyle değişimi

### Süperoksit radikalini temizleme özelliği

*Lallemantia canescens*'e ait örneklerin süperoksit radikalini temizleme özelliği, ksantin /ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit radikalinin nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgeme yöntemi ile belirlenmiştir.

*Lallemantia canescens*'in ve kallus doku kültürünün metanol özütlerinin derişimine karşı % inhibisyon grafikleri Şekil 3'te gösterilmiştir.

*Lallemantia canescens*'in metanol özütünün süperoksit radikalini temizlemede kallus doku kültürü metanol özütünden daha aktif olduğu bulunmuştur (Tablo 4).

### Lipid peroksit oluşumunun inhibisyonu

*Lallemantia canescens*'in metanol özütü ile kallus doku kültürü metanol özütünün, sıçan karaciğer homojenatında enzimatik olmayan  $Fe^{3+}$ /askorbat yöntemiyle gerçekleşen lipid peroksidasyonunu inhibisyonu incelenmiştir. Bu metod lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan spesifik bir ürün olan malondialdehitin (MDA), tiyobarbitürik asit ile tepkimeye girerek, 532 nm dalga boyunda, maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır.

*Lallemantia canescens*'in ve kallus doku kültürünün metanol özütlerinin derişimine karşı lipid

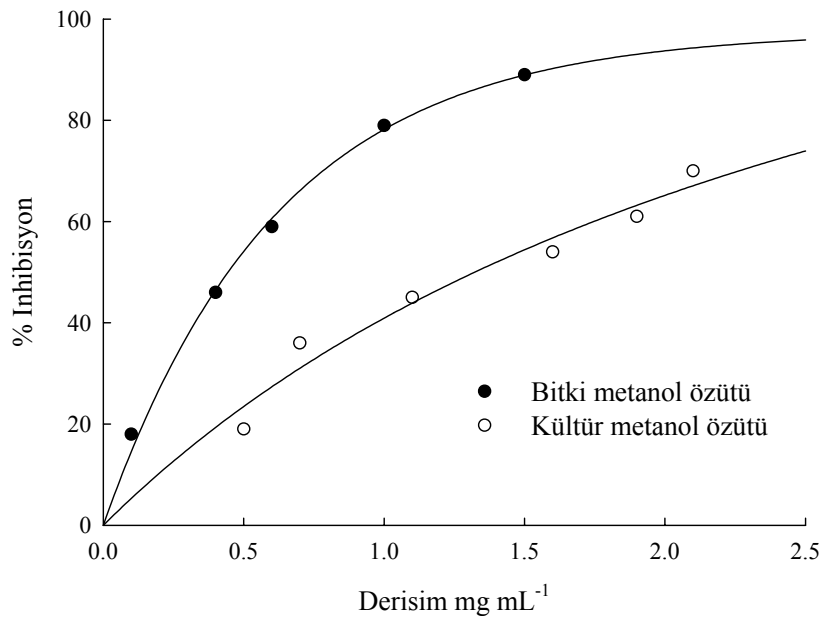
peroksidasyonunun % inhibisyon grafikleri Şekil 4'te gösterilmiştir. %50 inhibisyonun gerçekleştiği derişimler ise Tablo 5'te verilmiştir. Tablo 5'teki sonuçlarda; *Lallemantia canescens*'in metanol özütünün lipid peroksidasyonunu kallus doku kültürü metanol özütünden daha iyi inhibe ettiği görülmektedir.

Tablo 4. Süperoksit oluşumunu %50 inhibe eden *Lallemantia canescens*'in ve kallus doku kültürünün metanol özütleri ile pozitif kontrollerin derişimleri

Örnek	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Bitki metanol özütü	426.4 ± 5.3
Kültür metanol özütü	1262.0 ± 13.4
BHT	74.9 ± 2.4
Kurkumin	9.56 ± 0.9
Askorbik asit	1375.2 ± 8.7

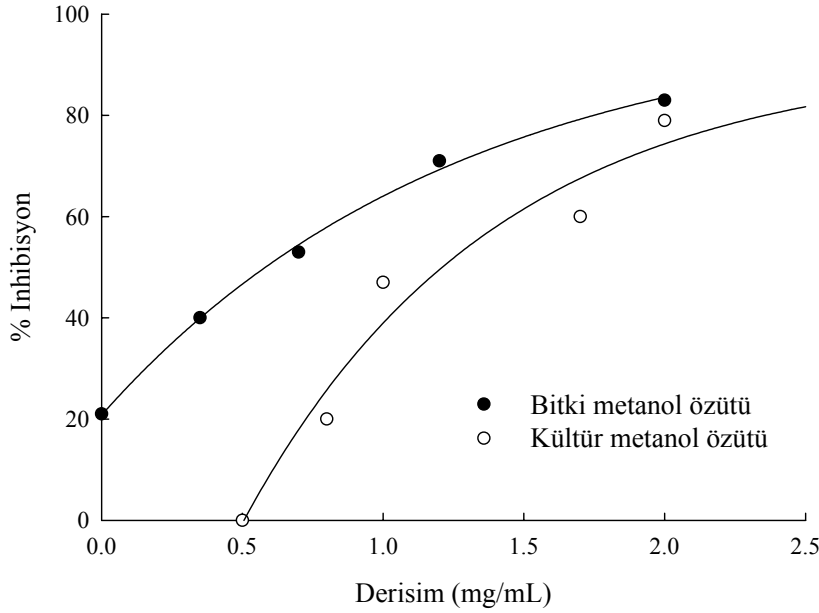
Tablo 5. *Lallemantia canescens*'in ve kallus doku kültürünün metanol özütleri ile pozitif kontrollerin lipid peroksidasyonunu %50 inhibe eden derişimleri

Örnek	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Bitki metanol özütü	682. ± 3.3
Kültür metanol özütü	1200.0 ± 13.4
BHT	87.5 ± 0.8
Kurkumin	39.5 ± 1.1



Şekil 3. Süperoksit radikalini inhibisyonunun örnek derişimleriyle değişimi





Şekil 4. Lipid peroksit inhibisyonunun örnek derişimleriyle değişimi

## Sonuçlar

Hidroksil radikali, DNA, lipidler, amino asitler ve şekerler gibi canlı hücrede bulunan moleküller için en zararlı olan serbest radikaldir. Vücutta bütün zarlardan kolaylıkla geçebilen hidrojen peroksit (Cadenas, 1989), süperoksit ile tepkimeye girerek reaktif ve toksik etkisi olan hidroksil radikali oluşumuna yol açmaktadır.  $Fe^{3+}$ /askorbat/EDTA/ $H_2O_2$  sistemi ile üretilen hidroksil radikali ile deoksiribozun bozunmasının, çalışılan *Lallemantia canescens*'in örnekleriyle inhibe edildiği bulunmuştur. Tablo 2'deki sonuçlarda görüldüğü gibi *Lallemantia canescens*'in taze ve metanol özütlerinin  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $176.5 \pm 2.3$  ve  $161.0 \pm 8.9 \mu g mL^{-1}$  hesaplanmış olup, bu değerler besin katkı maddesi olarak kullanılan ve antioksidan bir bileşik olan BHT'den daha iyidir. *Lallemantia canescens*'in DPPH temizleme özelliğinde ise taze kallus kültürü BHT'ye benzer aktivite gösterirken, diğer özütler BHT'den daha yüksek aktivite göstermişlerdir (Tablo 3).

Süperoksit ve hidroksil radikalleri, serbest radikalleri en çok temsil eden iki önemli radikaldir. Hüresel oksidasyon tepkimelerinde ilk önce süperoksit radikali oluşmakta ve diğer serbest oksijen radikallerinin üretimini oksidan ajanların varlığına bağlı olarak arttırmaktadır (Olanow, 1992).

*Lallemantia Canescens*'in ve kallus doku kültürünün metanol özütlerinin, süperoksit için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $426.4 \pm 5.3$  ve  $1262.0 \pm 13.4 \mu g mL^{-1}$  şeklindedir. Bitkinin ve kallus kültürünün metanol özütlerinin süperoksit radikalini temizleme özelliklerinin, pozitif kontrol olarak kullandığımız askorbik asitten daha yüksek, kurkuminden ise daha düşük oldukları gözlenmiştir (Tablo 4).

Çalışmamız da ayrıca *Lallemantia canescens*'in ve kallus doku kültürü metanol özütlerinin pozitif kontrollerimize göre yüksek olmasa da lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri bulunmuştur. %50 inhibisyonun gerçekleştiği derişimler ise *Lallemantia canescens*'in metanol özütü için  $682.0 \pm 3.3 \mu g mL^{-1}$ , kallus doku kültürü metanol özütü için ise  $1200.0 \pm 13.4 \mu g mL^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Tablo 5).

Bitkinin lipid peroksidasyonunu inhibe etmesinin, serbest radikalleri süpürme etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir. Çünkü süperoksit ve hidroksil radikalleri aktif olarak lipid peroksidasyonunun başlamasında rol almaktadır (Plaa ve Wischi, 1976). Ayrıca *Lallemantia canescens*'in flavonoid ve fenol içeriklerinin de yüksek olması serbest radikalleri temizlemede ve lipid peroksidasyonunu önlemede en önemli nedendir.

Sentetik antioksidanların yan etkileri ve bitkilerin kolay elde edilebilir olması nedeniyle, son yıllarda araştırmalar bitki özütlerinin antioksidan aktiviteleri üzerine yoğunlaşmıştır. Verna ve diğerleri (2008) tarafından yapılan çalışmada; *lichen Usnea ghattensis* metanolik özütünün lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, süperoksit, DPPH, nitrik oksit ve hidroksil radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. *Calpurnia aurea*'ın sap ve yaprak metanolik özütlerinin toplam fenol, flavonoid, flavonol ve proantosiyanidin içerikliği belirlenmiş, DPPH, ABTS ve FRAP metodlarıyla antioksidan aktivitesi saptanmıştır (Adepado vd., 2008). Adesegun ve diğerleri (2008) çalışmalarında, *Sapium ellipticum* metanol özütünün toplam fenol içeriğini saptamışlar ve lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi, serbest radikal süpürme aktivitesi ile metal şelatlama özelliğini bildirmişlerdir. *Lagerstroemia speciosa* (L). Yapraklarının etil asetat, etanol, metanol ve su özütlerinin süperoksit ile hidroksil radikallerini süpürdüğü ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Priya vd., 2008). Başka bir çalışmada, *Rhazya stricta* yapraklarının metanol özütünün antioksidan aktiviteye sahip olduğu; linoleik asit sistemi, metal şelatlama aktivitesi, indirgeme potansiyeli, DPPH ve süper oksit radikallerini süpürme aktivitelei incelenerek saptanmıştır (Iqbal vd., 2006).

Bitkilerin antioksidatif etkileri flavonoid (Pietta, 2000), fenolik asit ve fenolik diterpen (Shahidi ve Wanasundara, 1992) gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi onların redoks özelliklerinden dolayıdır. Flavonoidlerin düşük redoks potansiyeline sahip olmasından dolayı (0.23<ET<0.75V), redoks potansiyelleri 2.13-1.0 V arasında olan okside olmuş süperoksit, peroksil, alkoksil ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikallere (R.), H-atomu vererek onları termodinamik olarak indirgeyebilirler. Fenolik bileşikler serbest radikalleri nötralize etmede ve absorblamada, singlet ve triplet oksijenin yakalanmasında veya peroksitleri parçalamada önemli rol oynamaktadırlar (Rice-Evans vd., 1996).

Flavonoidler, ksantin oksidaz ve protein kinaz gibi süperoksit anyonu üretiminden sorumlu enzimleri inhibe etmektedir. Ayrıca bütün reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ilgili siklo-oksigenaz, hipoksigenaz, mikrozomal oksigenaz, glutatyon S-transferaz, mitokondrial süksinoksidaz ve NADH oksidazı da inhibe ettiği gösterilmiştir. Bir çok flavonoid, oksijen metabolizmasında önemli rol oynayan eser elementlerle şelat oluşturarak onları bloke etmektedir (Rice-Evans ve Miller, 1996).

Bitkisel kökenli fenolik bileşikler insan sağlığı ve besin lipidlerinin korunması gibi alanlarda kullanılabilir. Çeşitli bitkisel fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite potansiyelleri, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu inhibe etmelerine göre değerlendirilmiş ve karnosol, karnosonik asit ve rosmarinik asitin güçlü aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Pearson vd., 1997).

Bitkilerdeki flavonoidler genellikle glikozillenmiş türlerden oluşurlar ve çiçek ve meyvelerdeki mavi, kırmızı, turuncu gibi parlak renklerin oluşumundan sorumludurlar (Brouillard ve Cheminat, 1988). *Lallemantia canescens*'in de parlak mavi renklere sahip oluşu flavonoidlerin varlığının diğer bir kanıtıdır.

Kallus doku kültürü ile yapılan çalışmalardan da serbest radikallerin oluşumunun inhibe edildiği bulunmuştur. Böylece biyoaktif bileşenleri yüksek olan bitkilerle, radikalleri temizleyen sekonder metabolitlerin üretilebileceği gerçeği de ortaya konulmuştur. Rakotoarison ve diğerleri (1997), *Crataegus monogyna*'nın çiçeklerinde, in vitro kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin metanolik formlarının antioksidan aktivitelerini ölçmüşler total fenol miktarındaki azalmayı taze çiçek > hücre süspansiyon > kallus kültürü şeklinde bulmuşlardır. Ayrıca özütlerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve HOCl gibi reaktif oksijen türlerini temizleyici etkilerini belirleyerek, bitkinin antioksidan özelliğini in vitro olarak incelemişlerdir. Toplam fenol içeriklerine bağlı olarak tüm özütlerin bu radikalleri temizlediklerini bulmuşlardır. Çalışmamızda da toplam fenol içeriği en fazla olan bitki metanol özütünün, kallus kültürü

özütünden daha iyi radikal temizleyici olduğu bulunmuştur.

Çiçekler ve yaprakların çok sayıda polifenolik tür içerdikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Brouillard ve Cheminat, 1988). Rakotoarison ve diğerleri (1997) tarafından belirtildiğine göre; Stafford ve Cheng, bitki doku kültürlerinin çeşitli sekonder metabolitler ürettiklerini ve bazen bu ürünlerin orijinal bitkiden daha yüksek düzeyde olduğunu, özellikle polifenolik sınıfta fazla ürün elde edildiğini belirtmişlerdir. Yine Rakotoarison ve diğerleri (1997) tarafından belirtildiğine göre; Bahorun ve Kartnig, çalışmalarında *Crataegus monogyna*'nın kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin ilgi çekici polifenolikleri ürettiklerini ortaya koymuşlardır. Pavlov ve diğerleri (2002) kırmızı pancar kültürlerinde Betalainlerin biyosentezini gerçekleştirmişlerdir. Betalainler serbest radikalleri temizlemenin yanısıra, aktif oksijenin indirgenmesini ve serbest radikallerin biyolojik moleküllerde sebep oldukları oksidasyonu engellemektedirler. Yapılan bu çalışmada ayrıca, kültür etanol özütlerinin yüksek antiradikal aktivite gösterdiği ve kararlı DPPH radikalini % 83 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Çalışmamızda da kallus doku kültürü metanol özütünün % derişimine bağlı olarak, DPPH radikalinin inhibisyonunun arttığı bulundu. Tüm bu araştırmalar in vitro bitki dokularının, biyoaktif moleküllerin kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Tüm in vitro deneysel bulgular sonunda *Lallemantia Canescens*'in iyi bir antioksidan bitki olduğu ve bu bitkiden elde edilen kallus doku kültürünün de aynı aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur. Tüm deneysel parametrelerin grafiklerinden görüldüğü gibi, *Lallemantia canescens*'in serbest radikalleri temizleme aktivitesi (% inhibisyon olarak tanımlanan) derişime bağımlıdır ve artan özüt derişimiyle artmaktadır.

Toplam antioksidan özelliklerinin, toplam fenol ve flavonoid içerikleri ile doğru orantılı olduğu gözlenmiş, toplam fenol ve flavonoid içeriği

yüksek olan *Lallemantia canescens*'in metanol özütünün, antioksidan ve radikal temizleme özelliklerinin kallus doku kültürünün metanol özütünden yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 1). Bitki özütü, kallus özütüne göre daha yüksek oranda toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam antioksidan aktiviteye sahip olduğundan, kallus doku kültürü metanol özütüne göre daha fazla biyoaktif moleküllere sahiptir.

Ayrıca kallus doku kültürleri sayesinde antioksidan sekonder metabolitlerin üretilebileceği kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, test edilen antioksidan aktivitenin hangi aktif bileşenden kaynaklandığı tespit edilememiştir. Antioksidan aktivite ham özüt içerisindeki polifenollerin sinerjik etkilerinde kaynaklanabilir. Bu nedenle *Lallemantia Canescens*'in biyoaktif bileşenlerinin saptanması ve antioksidan bitki olduğunun in vivo deneylerle kanıtlanması gerekmektedir.

## Teşekkür

Projenin yürütülmesi için maddi destek sağlayan Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (CÜBAP – F 131) teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Adedapo, A.A., Jimoh, F.O., Koduru, S., Afolayan, A.J., Masika, P.J., (2008). Antibacterial and antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 20, 8, 53.
- Adesegun, S.A., Elechi, N.A., Coker, H.A., (2008). Antioxidant activities of methanolic extract of *Sapium ellipticum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(3), 453-457.
- Akkuş, İ., (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya;1:157.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., (1993). Oxidants, Antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings - National Academy Of Sciences USA*, 90, 17, 7915-22.
- Baranyk, P., Zeleny, V., Zukalova, H., Horejs, P., (1995). Oil content of some species of alternative oil plants. *Rostlinna Vyroba*, 41, 9, 433-438.

- Baser, K.H.C., Kurkcuoglu, M., Özek, T., (2000). Steam volatiles of *Lallemantia* (L.) Fisch et Mey. from turkey. *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 6, 689-690
- Block, G., (1992). The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutrition Reviews*, **50**, 7, 207-13.
- Brouillard, R., Cheminat, A., (1988). Flavonoids and plant color. *Progress in Clinical and Biological Research*, **280**, 93-106.
- Brown, M.L., (1990). (Ed) Present knowledge in nutrition. 6 th ed. Washington Dc International Life Sciences Institute-Nutrition Foundation; 5.
- Cadenas, E., (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, **58**, 79-110
- Cerutti, P., (1994). Oxy-radical and cancer: *Lancet*, **344**, 8926, 862-863.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O.H., (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144-1152.
- Dean, R.T., Gieseg, S., Davies, M.J., (1993). Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **18**, 11, 437-41.
- Diplock, A.T., Rice-Evans, C.A., Burdon, R.H., (1994). Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? *Cancer Research*, **54**, 7, 1952-1956.
- Ghannadi, A., Zolfaghari, B., (2003). Compositional analysis of the essential oil of *Lallemantia Royleana* (Benth. In Wall.) Benth. from iran. *Flavour and fragrance journal*, **18**, 3, 237-239.
- Gutteridge, J.M.C., (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **41**, 12, 1819-1828.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press: Oxford, 23-30.
- Halliwell, B., (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, **344**, 8924, 721-4.
- Hutchinson, J.F., Zimmerhan, R.H., (1987). Tissue culture of temperate fruit and nut trees. *Horticultural Review*, **9**, 273-349.
- Iqbal, S., Bhangar, M.I., Akhtar, M., Anwar, F., Ahmed, K.R., Anwer, T., (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from leaves of *Rhazya stricta*. *Journal of Medicinal Food*, **9**(2), 270-275.
- Jamzad, Z., Grayer, R.J., Kite, G.C., (2003). Leaf Surface flavonoids in iranian species of Nepata (Lamiaceae) and some related genera. *Biochemical Systematics Ecology*, **31**, 6, 587-600.
- Kunchandy, E., Rao, M.N.A., (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Clinical Pharmacology*, **58**, 237-240.
- Lamaison, J.L., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., (1990). Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae. *Annals of Pharmacology*, **48**, 6, 335-40.
- Lee, S.E., Ju, E.M., Kim, J.H., (2001). Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from Smilax china root. *Experimental and Molecular Medicine*, **33**, 4, 263-8.
- Lunec J., (1990). Free radicals: their involvement in disease processes. *Annals of Clinical Biochemistry*, **27**, 3, 173-82.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**, 351-358.
- Olanow, C.W., (1992). An introduction to the free radical hypothesis in parkinson's disease. *Annals of Neurology*, **32**, 2-9.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., Ilieva, M., (2002). Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of Red Beet (*Beta Vulgaris*) Hairy Root Cultures. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, **57**, 7-8, 640-644.
- Plaa, G.L., Witschi, H., (1976). Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **16**, 125-141.
- Pearson, D.A., Frankel, E.N., Aeschbach, R., German, J.B., (1997). Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 3, 578-582.
- Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as antioxidant. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035-1042
- Prieto, P.M., Pineda and M. Aguilar., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, **269**, 2, 337-341.
- Priya, T.T., Sabu, M.C., Jolly, C.I., (2008). Free radical scavenging and anti-inflammatory properties of *Lagerstroemia speciosa* (L). *Inflammopharmacology*, **16**(4), 182-187.

- Rakotoarison, D.A., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, J.C., Pinkas, M., (1997). Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, in vitro callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. *Pharmazie*, **52**, 1, 60-64.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, **20**, 7, 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, **24**, 3, 790-5.
- Robak, J., Gryglewski, R.J., (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 5, 837-841..
- Shahidi, F., Wanasundara, P.K., (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**, 1, 67-103.
- Verma, N., Behera, B.C., Makhija, U., (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of a lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(**2-3**), 167-181.