

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Cedrus libani* (SEDİR) VE  
*Abies cilicia* (KÖKNAR) REÇİNE ÖZÜTLERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDANT  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevcan ALTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

OCAK 2009

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Cedrus libani* (SEDİR) VE  
*Abies cilicia* (KÖKNAR) REÇİNE ÖZÜTLERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDANT  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevcan ALTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN

KİMYA ANABİLİM DALI


DİYARBAKIR

OCAK 2009

**T.C.**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**  
**DİYARBAKIR**

Sevcan ALTAŞ tarafından yapılan “*Cedrus libani* (Sedir) ve *Abies cilicia* (Kök nar) Reçine Özü tlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

	<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	<u>İmzası</u>
Başkan :	Prof. Dr. M. Çetin	AYTEKİN	
Üye :	Doç. Dr. Murat	KIZIL	
Üye :	Doç. Dr. Fikret	UYAR	

Tez Savunma Sınavı Tarihi : 23/01/2009

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../2009

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

## ÖZ

Gıdaların üretimi ve saklanması sırasında kullanılan sentetik antioksidantlar çeşitli metabolizma hastalıkları ve kansere neden olmaktadır. Günümüzde antibiyotiklere dirençli enfeksiyonların arttığı gözlenmektedir. Bunlarla mücadele etmek için yeni ilaçların araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Sentetik ilaçların etkinliklerinin yanında pahalı olmaları, mikroorganizmalarda direnç oluşturmaları ve zehirli etkilerinin bulunmasından dolayı dikkatler bitkisel ilaçlara yönelmiştir. Bitkisel ilaçlar, hem sentetik ilaçlarla birlikte tedavide kullanılırlar hem de tek başlarına alternatif tıpta kullanılırlar.

*Cedrus libani* ve *Abies cilicia*'nın yaprak, kozalak ve reçinelerinin halk arasında iyileştirici etkisi olduğuna inanılmakla birlikte bunlar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu amaçla, *Cedrus libani* ve *Abies cilicia* reçinelerinin *in vitro* antioksidant ve antimikrobiyal aktiviteleri test edildi.

*Cedrus libani* (Sedir) ve *Abies cilicia* (Köknar) reçinelerinin ham ekstraktları, metanol ve hegzan ekstraktları ve metanol ekstraktından elde edilen bütün fraksiyonların (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5) toplam fenolik ve toplam flavonoid bileşen miktarları incelendi. Gallik asit ve quercetin standart fenolikler olarak kullanıldı. Bunlardan; SFr2 ( $315.51 \pm 13.36 \mu\text{g}$  GAE/mg reçine) ile Köknar (Ham) ( $56.52 \pm 4.60 \mu\text{g}$  GAE/mg reçine) en fazla toplam fenolik bileşen ve SFr5 ( $4.47 \pm 0.07 \mu\text{g}$  QUE/mg reçine) ile KFr5 ( $2.87 \pm 0.03 \mu\text{g}$  QUE/mg reçine) en fazla toplam flavonoid bileşen içermekteydi.

Sedir ve Köknar reçinelerinin metanol ekstraktları ile SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve KFr5 fraksiyonlarına 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) radikalini söndürme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve indirgeme gücü, *in vitro*, antioksidant testleri

uygulandı. Butillenmiş hidroksianisol (BHA) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT) standart antioksidant ve EDTA standart metal şelatlayıcı olarak kullanıldı. SFr2 fraksiyonu en yüksek indirgeme gücü ve DPPH radikalini söndürme aktivitesi (%  $92.10 \pm 3.78$ ) gösterdi. Metal şelatlama aktivitesi Köknar (MeOH), KFr5, SFr4 ve SFr5 dışındaki test numunelerinde gözlenemedi. Bu testte KFr5 (%  $63.06 \pm 0.78$ ) fraksiyonu en yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdi.

Sedir ve Köknar reçinelerinin ham, metanol ve hegzan ekstraktları ile bütün fraksiyonlarının (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve SFr6 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5) antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile test edildi. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pyogenes* standart bakteri suşları ile *Candida albicans* klinik izolatu ve İmipenem, Ofloksasin, Netilmisin, Amoksisilin ile Amfoterisin B standart antibiyotikleri kullanıldı. Reçine örneklerinin (40, 60 ve 80 µg/kağıt disk) standart mikroorganizmaların büyümesi üzerinde 8-16 mm inhibisyon çapı oluşturduğu gözlemlendi.

**Anahtar sözcükler:** *Cedrus libani*, *Abies cilicia*, Antioksidant aktivite, Antimikrobiyal aktivite.

## ABSTRACT

The synthetic antioxidants used in food production and protection lead to various metabolic diseases such as cancer. Nowadays, there is an increase in bacterial resistance to antibiotics. Assays are devoted to explore new drugs to struggle with these diseases. Although synthetic drugs are more effective than that of herbal remedies, they are expensive, have toxic effects and can cause resistance against microorganisms. Therefore, herbal remedies have attracted considerable attention. Herbal remedies are used both in curing with synthetic drugs and alone in alternative medicine.

It is believed that leaves, cones and resins of *Cedrus libani* and *Abies cilicia*, have medicinal effects. Hence, they are used for treatment of various diseases in traditional medicine. For this purpose, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Cedrus libani* and *Abies cilicia* resins were investigated.

Crude extracts, methanol extracts and hexane extracts and all fractions were fractionated from methanol extracts (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5, KFr1, KFr2, KFr3, KFr4, and KFr5) of *Cedrus libani* and *Abies cilicia* were analysed for their total phenolic and flavonoid contents. Gallic acid and quercetin were used as standard phenolics. The highest contents of phenolics were observed for SFr2 ( $315.51 \pm 13.36$   $\mu\text{g GAE/mg resin}$ ), and *Abies* (crude extract) ( $56.52 \pm 4.60$   $\mu\text{g GAE/mg resin}$ ) and the highest contents of flavonoids were observed for SFr5 ( $4.47 \pm 0.07$   $\mu\text{g QUE/mg resin}$ ) and KFr5 ( $2.87 \pm 0.03$   $\mu\text{g QUE/mg resin}$ ).

Methanol extracts, and SFr2, SFr3, SFr4, SFr5, KFr5 fractions were investigated for their antioxidant activity, *in vitro*, by using three different antioxidant assays such as 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical scavenging

activity, metal chelating activity and reducing power. Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as standard antioxidants and EDTA was used as standard metal chelator. SFr2 was showed the highest reducing power, and DPPH radical scavenging activity ((%  $92.10 \pm 3.78$ ). On the other hand, the metal chelating activity for all test samples were not evaluated, except *Abies* (methanol extract), KFr5, SFr4 and SFr5. In this assay, the highest metal chelating activity was observed for KFr5 (%  $63.06 \pm 0.78$ ).

The antimicrobial activity of crude extracts, methanol extracts and hexane extracts and all fractions that were fractioned from methanol extracts (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5, SFr6, KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 and KFr5) of *Cedrus libani* and *Abies cilicia* was tested by paper disc diffusion method. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus pyogenes*, and yeast fungus *Candida albicans* clinical isolate were used as a standart strain. Imipenem, Ofloksasin, Netilmisin, Amoxycillin, and Amfoterisin B antibiotics were used as a standart antibiotics. Resin samples (40, 60 and 80  $\mu\text{g}$ /paper disc) were showed 8-16 mm inhibition zones against standard microorganisms growth.

**Keywords:** *Cedrus libani*, *Abies cilicia*, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim için konu seçimi, materyal temini ve çalışmaların yönlendirilmesinden sonuçlanmasına kadarki süreçte her türlü sorunla büyük özveriyle ilgilenen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince bana çalışma ortamı sağlayan ve benden desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Murat KIZIL, Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL ve Doç. Dr. Göksel KIZIL'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her türlü bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen Arş. Gör. Murat YAVUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın bir kısmını Biyoloji Bölümü Botanik Araştırma Laboratuvarında yapmam için olanak sağlayan Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN ve Yrd. Doç. Dr. Zuhale TOKER'e teşekkür ederim.

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

Bu projeye maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP-07-01-23) teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımın aksamaması için bana uygun çalışma ortamı sağlayan Mardin Valisi Sayın Mehmet KILIÇLAR'a, Mardin İl Sağlık Müdürü Sayın M. Sait AVAR'a, Mardin Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Başhekimi Uz. Dr. A. Fettah OĞUZ'a, Hastane Müdürü M. Sait UÇER ve laboratuvar personeline teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarları paylaştığım arkadaşlarım Arş. Gör. Bircan ÇEKEN, Sevil EMEN ve Arş. Gör. Hüseyin ALKAN'a gösterdikleri ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Gösterdiği anlayış ve destekten dolayı aileme teşekkür ederim.



## **İÇİNDEKİLER**

<b>ÖZ</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1. 1. KAYNAKLAR	3
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b>	<b>4</b>
2. 1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	4
2. 1. 1. Süperoksit Radikali	5
2. 1. 2. Hidroksil Radikali	6
2. 1. 3. Hidrojen Peroksit	7
2. 1. 4. Singlet Oksijen	8
2. 1. 5. Nitrik Oksit	8
2. 1. 6. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları	9
2. 1. 6. 1. Mitokondrial elektron taşıma zinciri	10
2. 1. 6. 2. Araşidonik asit metabolizması	11
2. 1. 6. 3. Geçiş metal iyonları	11
2. 1. 6. 4. Fagositik solunum	12

2. 1. 6. 5. Eksojen oksidant kaynakları	13
2. 2. SERBEST RADİKALLERİN İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ	14
2. 2. 1. Lipid Oksidasyonu	14
2. 2. 1. 1. Başlangıç	16
2. 2. 1. 2. Yayılma	16
2. 2. 1. 3. Sonlanma	18
2. 2. 2. Protein Oksidasyonu	18
2. 2. 3. Karbohidrat Oksidasyonu	18
2. 2. 4. DNA Oksidasyonu	19
2. 3. ANTİOKSİDANT MEKANİZMALAR	19
2. 3. 1. Önleyici Antioksidantlar	20
2. 3. 1. 1. Metal şelatlayıcılar	20
2. 3. 1. 2. Singlet oksijen söndürücüler	20
2. 3. 1. 3. ROS detoksifikasyonu	21
2. 3. 2. Zincir-kıran Antioksidantlar	21
2. 3. 3. Prooksidant Etkiler	22
2. 4. RADİKALLERİN NEDEN OLDUĞU HASARLAR	22
2. 4. 1. Hastalıklarda Reaktif Oksijen Türlerinin Etkisi	22
2. 4. 2. Karsinogenezis ve kanser nedenleri	23
2. 4. 3. Kanserde ROS Dengesi	23
2. 4. 4. Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz	24
2. 4. 5. Apoptotik (Programlanmış Hücre Ölümü) Yanıt	25
2. 4. 6. Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi	25
2. 5. METABOLİK RADİKAL SÖNDÜRÜCÜLER	26

2. 5. 1. Endojen Antioksidantlar	26
2. 5. 1. 1. Enzimatik Antioksidantlar	26
1. 5. 1. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidantlar	28
2. 5. 2. Eksojen Antioksidantlar	30
1. 5. 2. 1. Vitaminler	30
1. 5. 2. 2. İlaçlar	31
1. 5. 2. 3. Gıdalarda kullanılan eksojen antioksidantlar	32
2. 6. ŞİFALI BİTKİLER	32
2. 6. 1. Bitkilerin Tedavideki Yeri	32
2. 6. 2. Bitkisel Sekonder Metabolitler	33
2. 6. 2. 1. Bitkilerin önemli antioksidant bileşenleri	34
2. 6. 2. 1. 1. Fenolik Bileşikler	34
2. 6. 2. 1. 2. Karotenoidler	36
2. 6. 2. 1. 3. Taninler	36
2. 6. 2. 1. 4. Flavonoidler	36
2. 6. 2. 1. 5. Alkaloidler	37
2. 6. 2. 1. 6. Terpenler	37
2. 6. 3. Sekonder Metabolitleri Ayırma Metodları	38
2. 6. 3. 1. Ekstraksiyon teknikleri	38
2. 6. 3. 2. Zenginleştirme	40
2. 6. 3. 2. 1. Kolon Kromatografisi	41
2. 6. 3. 2. 2. Hareketli Faz Çözücü Seçimi	42
2. 6. 3. 3. Kimyasal ayırma metodları (Kromatografi)	43
2. 6. 4. Antimikrobiyal Karakter	45

2. 6. 4. 1. Bitkisel uçucu yağların antimikrobiyal Özellikleri	46
2. 6. 5. Bitki ve Bitkisel Ürünlerin İlaçlarla Oluşturduğu Yan Etkiler	47
2. 7. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	48
2. 8. KAYNAKLAR	57
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>66</b>
3. 1. MATERYAL	<b>66</b>
3. 1. 1. Reçineleri Kullanılan Ağaçların Türü, Yayılışı ve Reçinelerin Halk Arasında Kullanım Alanları	66
3. 1. 1. 1. Sedir ağacı	66
3. 1. 1. 2. Sarı katran	68
3. 1. 1. 3. Köknar ağacı	69
3. 1. 1. 4. Köknar reçinesi	70
3. 1. 2. Kullanılan Mikroorganizmalar	72
3. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	72
3. 1. 4. Kullanılan Aletler	73
3. 2. METOD	74
3. 2. 1. Antioksidant Aktivitenin Araştırılması	74
3. 2. 1. 1. Reçinelerin temizlenmesi, ekstraksiyonu	74
3. 2. 1. 2. Reçine ekstraktlarının kolon kromatografisi ile zenginleştirilmesi ve antioksidant aktivitesi yüksek fraksiyonların tayini	74
3. 2. 1. 3. Stok reçine çözeltilerinin hazırlanması	77

3. 2. 1. 4. Toplam fenolik bileşen miktar tayini	77
3. 2. 1. 5. Toplam flavonoid bileşen miktar tayini	79
3. 2. 1. 6. İndirgeme gücü	81
3. 2. 1. 7. DPPH radikalini söndürme aktivitesi	82
3. 2. 1. 8. Metal şelatlama aktivitesi	84
3. 2. 2. Antimikrobiyal Aktivite	86
3. 2. 2. 1. Stok reçine çözeltilerinin hazırlanması	86
3. 2. 2. 2. Disk diffüzyon yöntemi	86
3. 2. 2. 3. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve disk diffüzyon testinin uygulanması	86
3. 2. 3. İstatiksel Analiz	87
3. 3. KAYNAKLAR	88
<b>4. BULGULAR</b>	<b>90</b>
4. 1. TOPLAM FENOLİK BİLEŞEN MİKTAR TAYİNİ	90
4. 2. TOPLAM FLAVONOİD BİLEŞEN MİKTAR TAYİNİ	91
4. 3. İNDİRGEME GÜCÜ	92
4. 4. DPPH RADİKALİNİ SÖNDÜRME AKTİVİTESİ	92
4. 5. METAL ŞELATLAMA AKTİVİTESİ	93
4. 6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE	94
4. 7. ŞEKİLLER, ÇİZELGELER, RESİMLER	96
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>112</b>
5. 1. KAYNAKLAR	123
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>124</b>

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

**Çizelge 4.7.1:** Sedir ve Köknar reçinelerinin içindeki gallik aside eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları.

**Çizelge 4.7.2:** Sedir ve Köknar reçineleri içindeki quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları.

**Çizelge 4.7.3:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

**Çizelge 4.7.4:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini söndürme aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

**Çizelge 4.7.5:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

**Çizelge 4.7.6:** Sedir (*Cedrus libani*) ve fraksiyonlarının mikroorganizmaların büyümeleri üzerinde engelleme etkisinin verileri.

**Çizelge 4.7.7:** Köknar (*Abies cilicia*) ve fraksiyonlarının mikroorganizmaların büyümeleri üzerinde engelleme etkisinin verileri.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1:** ROS kaynakları.

**Şekil 2.2:** Hücresele oksidatif etkileşimler.

**Şekil 2.3:** Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyon zinciri.

**Şekil 2.4:** Tokoferol, Tokotrienol ve Troloks kimyasal yapısı.

**Şekil 2.5:** Bitkisel Fenolik Bileşikler.

**Şekil 2.6:** Alkoloid molekülünün kimyasal yapısı.

**Şekil 2.7:** Monoterpen ve Diterpenlere örnek.

**Şekil 3.1:** Gallik asit molekülü.

**Şekil 3.2:** Quercetin molekülü.

**Şekil 3.3:** 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) molekülü.

**Şekil 3.4:** Ferrozine molekülü.

**Şekil 4.7.1:** Gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerlerinin grafiği.

**Şekil 4.7.2:** Quercetinin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerlerinin grafiği.

**Şekil 4.7.3:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analiz verilerinin grafiği.

**Şekil 4.7.4:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini söndürme aktivitesinin spektrofotometrik analiz verilerinin grafiği.

**Şekil 4.7.5:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin spektrofotometrik analiz verilerinin grafiği.

## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 3.1:** Sedir Ağacı

**Resim 3.2:** Sedir Ağacı

**Resim 3.3:** Köknar Ormanı

**Resim 3.4:** Doğal Reçine

**Resim 3.5:** Dünyanın en yaşlı ağacı

**Resim 4.7.1:** Çeşitli antibiyotiklerin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

**A1) Antibiyotikler 1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)

**A2) Antibiyotikler 3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)

**Resim 4.7.2:** Çeşitli antibiyotiklerin *E.coli* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

**A1) Antibiyotikler 1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)

**A2) Antibiyotikler 3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)

**Resim 4.7.3:** Çeşitli antibiyotiklerin *P. aureginosa* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

**A1) Antibiyotikler 1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)

**A2) Antibiyotikler 3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)

**Resim 4.7.4:** Çeşitli antibiyotiklerin *S. pyogenes* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

**A1) Antibiyotikler 1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)

**A2) Antibiyotikler 3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)

**Resim 4.7.5:** Çeşitli antibiyotiklerin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

**A1) Antibiyotikler 1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)

**A2) Antibiyotikler 3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)



**Resim 4.7.6:** Amfoterisin B'nin *C. Albicans* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

**1:** 10 µg/kağıt disk **2:** 20 µg/kağıt disk **3:** 40 µg/kağıt disk

**Resim 4.7.7:** Köknar reçinesinin *B. Subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

KFr1 : Köknar Metanol Ekstraktının 1. Fraksiyonu

KFr2 : Köknar Metanol Ekstraktının 2. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.8:** Köknar reçinesinin *B. Subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

KFr4 : Köknar Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

KFr5 : Köknar Metanol Ekstraktının 5. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2 :** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.9:** Köknar reçinesinin *C. albicans* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

KFr4 : Köknar Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

KFr5 : Köknar Metanol Ekstraktının 5. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.10:** Köknar reçinesinin *E. coli* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

K.HEG. : Köknar Hegzan Ekstraktı

KFr3 : Köknar Metanol Ekstraktının 3. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.11:** Köknar reçinesinin *S. Aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

K.HAM : Köknar Ham Reçinesi

K.HEG. : Köknar Hegzan Ekstraktı

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.12:** Köknar reçinesinin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

KFr1 : Köknar Metanol Ekstraktının 1. Fraksiyonu

KFr4 : Köknar Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.13:** Köknar reçinesinin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

S.HAM : Sedir Ham Reçinesi

S.HEG. : Sedir Hegzan Ekstraktı

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.14:** Sedir reçinesinin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

SFr4 : Sedir Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

SFr5 : Sedir Metanol Ekstraktının 5. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.15:** Sedir reçinesinin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

S.HAM : Sedir Ham Reçinesi

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

**Resim 4.7.16:** Sedir reçinesinin *S. pyogenes* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

SfR2 : Sedir Metanol Ekstraktının 2. Fraksiyonu

SFr3 : Sedir Metanol Ekstraktının 3. Fraksiyonu

**1:** 40 µg reçine/kağıt disk **2:** 60 µg reçine/kağıt disk **3:** 80 µg reçine/kağıt disk

## KISALTMALAR

AH:	Antioksidant
AMC:	Amoksisilin
ASE:	Basınçlı akışkan ekstraksiyonu
ATCC:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP:	Adenozietrifosfat
BDE:	Bağ ayrışma enerjisi
BHA:	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT:	Bütillenmiş hidroksi toluen
BuOH:	Butanol
CAT:	Katalaz
CCC:	Ters akım kromatografisi
cGMP:	Siklik (halkasal) guanozin monofosfat
CVD:	Kardiyovasküler hastalıklar
DAD:	İnhibisyon zon çapı
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DPPH:	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
EtOAc:	Etil asetat
GHz:	Gigahertz
GAE:	Gallik asit ekivalenti
GC:	Gaz kromatografisi
GSH:	Glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz

GST:	Glutasyon S-transferaz
Hex:	Hegzan
HPLC:	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HSV-1:	Herpes simpleks virüs tip 1
IPM:	İmipenem
IR:	Kızılötesi
kHz.	Kilohertz
Köknar (Ham):	Ham Köknar Reçinesi
Köknar (Heg):	Köknarın hegzan ekstraktı
Köknar (MeOH):	Köknarın metanol ekstraktı
KFr1:	Köknarın metanol ekstraktının 1. fraksiyonu
KFr2:	Köknarın metanol ekstraktının 2. fraksiyonu
KFr3:	Köknarın metanol ekstraktının 3. fraksiyonu
KFr4:	Köknarın metanol ekstraktının 4. fraksiyonu
KFr5:	Köknarın metanol ekstraktının 5. fraksiyonu
LC:	Sıvı kromatografisi
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH:	Yağ asidi
MDA:	Malondialdehit
MLT:	Melatonin
MPa:	Megapaskal
MS:	Kütle spektroskopisi
MTT Testi:	Mitokondriyel dehidrogenaz aktivitesi
MWE:	Mikrodalga destekli ekstraksiyon

NA:	Nutrient agar
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NB:	Nutrient broth
NBT:	Süperoksit radikal süpürme aktivitesi
NCCLS:	National Committee for Clinical Laboratory Standarts
NET:	Netilmisin
NMR:	Nükleer magnetik rezonans
NOS:	Nitrik oksit sentaz enzimi
OFX:	Ofloksasin
OTC:	Tezgah üstü
oxLDL:	Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein
QUE:	Quercetin ekivalenti
p53:	Tümör süpressör gen proteini
PCL:	Fotokemilüminesans
RNS:	Reaktif azot türleri
ROS:	Reaktif oksijen türleri
Sedir (Ham):	Ham Sedir Reçinesi
Sedir (Heg):	Sedirin hegzan ekstraktı
Sedir (MeOH):	Sedirin metanol ekstraktı
SFr1:	Sedirin metanol ekstraktının 1. fraksiyonu
SFr2:	Sedirin metanol ekstraktının 2. fraksiyonu
SFr3:	Sedirin metanol ekstraktının 3. fraksiyonu
SFr4:	Sedirin metanol ekstraktının 4. fraksiyonu
SFr5:	Sedirin metanol ekstraktının 5. fraksiyonu

SFr6:	Sedirin metanol ekstraktının 6. fraksiyonu
SD:	Standart sapma
SDA:	Sabouraud % 4 Dextrose Agar
SDB:	Sabouraud % 2 Dextrose Broth
SFE:	Süper kritik akışkan ekstraksiyonu
SOD:	Süperoksit dismutaz
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences
TCA:	Trikloro asetik asit
TLC:	İnce tabaka kromatografisi
UV:	Ultraviyole
VSMC:	Vasküler düz kas hücreleri
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal fizyolojik olaylar sırasında oluşmaktadırlar ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatıp, lipid peroksitlerin birikmesine öncülük edebilirler. Ancak, ROS antioksidant savunma sistemi tarafından uzaklaştırılırlar. ROS oluşumu ve antioksidant sistem tarafından etkisizleştirilmesi arasında bir denge vardır. Patolojik durumlarda bu denge bozulup, ROS oluşumu oksidatif strese neden olmaktadır. ROS ve antioksidant savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik hücrel membranlar veya hücreiçi molekülde oksidatif modifikasyonlara yol açar.<sup>1</sup>

Antioksidantlar vücudu serbest radikallerden ve ROS etkilerinden korur ve birçok kronik hastalığı geciktirir. Bu özelliklerinden dolayı antioksidant bileşiklere olan ilgi artmış, son yıllarda özellikle bitki kaynaklı antioksidantlar araştırma konusu olmuştur.<sup>2</sup>

Türkiye bitki türü çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerindedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.<sup>3</sup>

*Cedrus libani*, Lübnan Sediri veya Toros Sediri olarak da bilinir, çamgiller (*Pinaceae*) familyasının bir türüdür. Halk arasında yaprakları, kozalakları ve reçinesinin iyileştirici ve antiseptik etkisi olduğuna inanılır. Akne, dermatit, egzama, nezle, bronşit, artrit, romatizma, sistit, mantar hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Reçinesi haricen hayvanların deri hastalıklarında ve derilerinde bulunan bazı parazitlerin (kene, bit, sinek gibi) temizlenmesinde kullanılır.<sup>4-6</sup>

*Abies cilicia*, çamgiller (*Pinaceae*) familyasının iğne yapraklı ağaç türlerindedir.<sup>7</sup> Reçine ve yapraklarının tedavi edici etkisi vardır. Halk arasında saç

dökülmesinde, nefes darlığında espektoran ve balgam sökücü olarak ve enteritte kullanılmaktadır. Reçinesi haricen antiseptik ve çıban iyileştirici olarak yakı veya merhem halinde kullanılır.<sup>5</sup>

*Cedrus libani* ve *Abies cilicia* reçinelerinin antioksidant ve antimikrobiyal aktivitelerini test etmek amacıyla bu reçinelerden elde edilen kısımlara *in vitro* antioksidant aktivite ve antimikrobiyal aktivite testleri uygulandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; taze toplanmış aynı ya da farklı bitki reçinelerinin ayrıntılı fraksiyonlandırma ve saf bileşen elde etme çalışmaları ile araştırmanın amacına yönelik daha anlamlı sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Gülçin, İ. *Life Sciences*, **2006**, 78, 803-811.
2. Gökpınar, Ş.; Koray,T.; Akçiçek, E.; Göksan, T.; Durmaz, Y. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, **2006**, 23, 85-89.
3. Toroğlu, S.; Çenet, M. *Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar*, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 2006.
4. Yıldırım, A.; Kerim, G. *Bitki Biyolojisi Botanik*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
5. Yeşilada, E.; Gürbüz, İ.; Shibata, H. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 66, 289-293.
6. Taylor, S. *Bir Gezgin için Türkiye'deki Odunsu Bitkiler Kılavuzu*, Redhouse Yayınevi, İstanbul, Türkiye, 1986.
7. Nebi, B. Toros Sediri'nde (*Cedrus libani* A. Rich.) boy, çap ve hacim için yaşlar arası fenotipik ilişkiler, *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, **2004**, 1, 12-18.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Hücre sel yükseltgenme indirgenme tepkimeleri sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) yan ürün olarak meydana gelir. Bu türler hem zehirli hem de yararlı etkiler gösterirler. Bu iki etki arasındaki hassas denge yaşam için önem taşır. Düşük veya orta seviyelerdeki ROS ve RNS derişimi hücre sel yanıtlar ve immün fonksiyonların gerçekleşmesinde rol alırlar. Yüksek derişimlerde, bütün hücre sel yapılar a hasar verebilen zararlı bir süreç olan oksidatif stresi oluştururlar. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidantlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Oksidatif stres tamamen düzeltilemezse kronik ve dejeneratif çeşitli hastalıklara neden olur.<sup>1,2</sup>

### 2. 1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

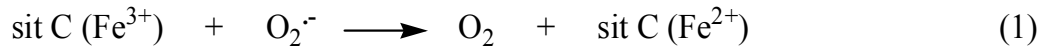
Moleküler oksijen, temel halde eşleşmemiş iki elektronu olan kararlı bir diradikaldir.<sup>3</sup>

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve bunların insan fizyopatolojileri üzerindeki etkileri son yıllarda sağlık sektörünün büyük ilgisini çekmiştir. Bunlar moleküler oksijen metabolizmasından türerler.<sup>4,5</sup> ROS aktifleşmiş oksijenin çeşitli formlarıdır. Bu formlar, **süperoksit anyon radikali** ( $O_2^-$ ) ve **hidroksil radikali** ( $HO^\bullet$ ), serbest radikal olmayan **hidrojen peroksit** ( $H_2O_2$ ) ve **singlet oksijen** ( $^1O_2$ )'dir.<sup>6-9</sup> Oksijenin metabolik olarak bu oldukça reaktif ve zehirli türlere indirgenmesi sonucu zararlı etkiler oluşur.<sup>10</sup>

### 2. 1. 1. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali birçok aerobik hücrede moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Direk olarak hücrelere zarar vermez. Ancak hidrojen peroksit kaynağı olarak ya da geçiş metal iyonlarını indirgeyerek zarara neden olur. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, protonlanarak oksidan perhidroksi radikalini ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturur. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali etkileşince biri yükseltgenir diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.

Süperoksit radikali hem yükseltgetici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene yükseltgenir (Reaksiyon 1). Epinefrinin oksidasyonunda ise yükseltgen olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) indirgenir.

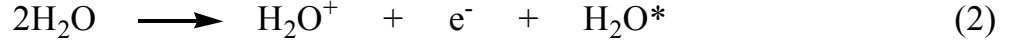


Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit ( $NO_2^{\cdot}$ ) ve nitrat ( $NO_3^{\cdot}$ ) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit radikali ( $NO_2^{\cdot}$ ), hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ), nitronyum iyonu ( $NO_2^+$ ) gibi zehirli ürünlere dönüşebilir, ancak, nitrik oksidin ( $NO^{\cdot}$ ) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur.<sup>11</sup>

## 2. 1. 2. Hidroksil Radikali

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir.

1. İyonlaştırıcı radyasyon etkisi ile sulu ortamda su molekülleri iyonlaşır.



Uyarılmış su molekülünün ( $\text{H}_2\text{O}^*$ ) homolitik yıkılımı ve  $\text{H}_2\text{O}^+$  bir su molekülü ile tepkimeye girmesi sonucu hidroksil radikali oluşur. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen  $\cdot\text{OH}$ , canlılarda zehirli etkiye neden olur.

2. Vücutta hidrojen peroksidin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi hidroksil radikali oluşmasında rol alır. Bu indirgenme reaksiyonu Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir.

Biyolojik sistemlerde hidroksil radikalinin tepkimeleri:

- a. Elektron transfer tepkimeleri
- b. Hidrojen çıkarma tepkimeleri (Hidroksil radikali organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgenir.)
- c. Katılma tepkimeleri (Pürin ve pirimidin bazları ile aromatik asitler gibi elektronca zengin moleküllerle gerçekleşir.)

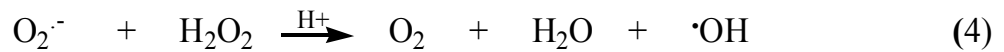
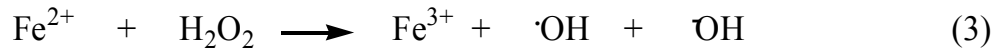
Bu tepkimeler,  $\cdot\text{OH}$ 'ın dış orbitalindeki ortaklanmamış elektronundan kaynaklanmaktadır.

Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Ayrıca nükleik asitler ve proteinlerde de radikalik zincir tepkimelerine yol açar.<sup>11</sup>

### 2. 1. 3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur.<sup>4</sup> Enzimatik olmayan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise nötral ya da alkali pH'da daha hızlıdır.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol alır. Çünkü Fe<sup>2+</sup> veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu (Reaksiyon 3) sonucu, süperoksit radikali varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu (Reaksiyon 4) sonucu hidroksil radikalini (<sup>•</sup>OH) oluşturur.



Süperoksit radikali yağda az çözüldüğü halde hidrojen peroksit yağda iyi çözünür. Bundan dolayı hidrojen peroksit oluştuğu yerden uzakta olan fakat Fe<sup>2+</sup> içeren membranlarda Fenton reaksiyonu aracılığıyla hasar oluşturabilir.<sup>11</sup>

#### **2. 1. 4. Singlet Oksijen**

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan formudur. Aldığı enerjiyi dalga şeklinde yayar. Vücutta şu mekanizmalarla oluşabilir:

1. Pigmentlerin (nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
2. Metal iyonları varlığındaki hidroperoksitlerin yıkım tepkimelerinde
3. Dismutasyon tepkimeleri sırasında
4. Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom p450 tepkimeleri sırasında

Bu tepkimeler sonucu iki tip singlet oksijen meydana gelir. Bunlar; sigma singlet oksijen (yüksek enerjili ve kısa ömürlüdür) ve delta singlet oksijendir (uzun ömürlüdür, kimyasal reaksiyonlardan sorumludur).

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve ·OH kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.<sup>11</sup>

#### **2. 1. 5. Nitrik Oksit**

Nitrik oksitteki ortaklanmamış elektron azot ve oksijen üzerinde delokalize haldedir. Bundan dolayı nitrik oksidin etkinliği baskılanır ve diğer radikallere göre daha kararlı hal alır.<sup>12</sup>

Nitrik oksit vücudumuzda nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında ve nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Düz kasa kolayca geçerek guanilat siklaz enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP

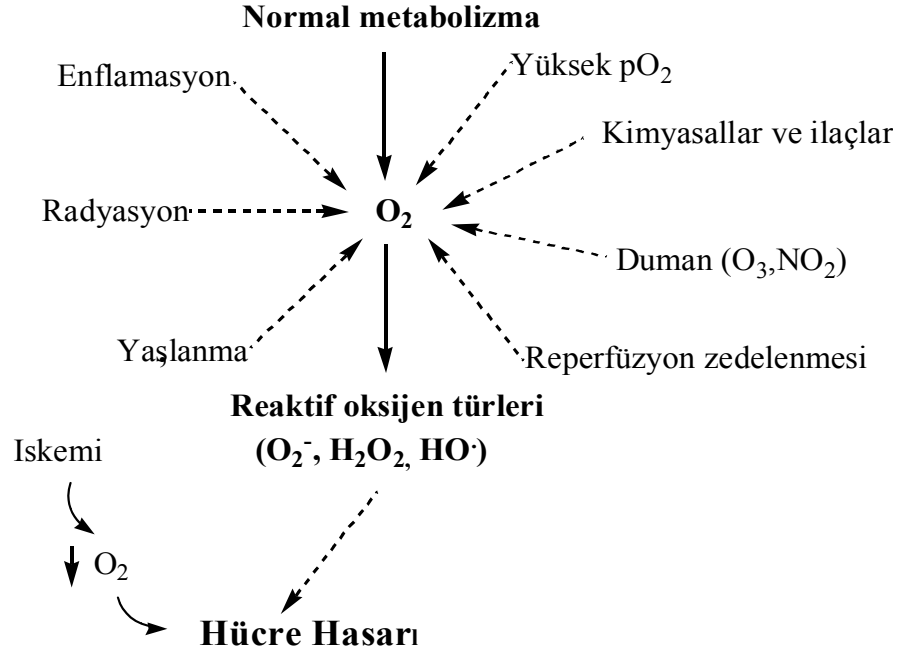
sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. **NO, oluşmuş olan ROS'ları ile tepkimeye girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmakta ve bunun bozulmasıyla ·OH radikali oluşumuna neden olmaktadır.**<sup>13,14</sup>

Nitrik oksidin radikal etkinliği düşük olup, metal içeren merkezler ve radikallerle tepkimeye girer. Özellikle lipid radikalleriyle tepkimeye girmesi NO'e antioksidant aktivite kazandırır.

Fizyolojik değişimde üretilen NO oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikalleri gibi nitrik oksidi ortamdaki uzaklaştıran enzimler yoktur. Aerobik ortamda nitrik oksit kararlı değildir. Miktarının artması ile oksidasyonu hızlanır ve böylece ortamdaki miktarı ile kendi ömrü arasında ters orantı oluşur.<sup>12</sup>

### **2. 1. 6. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları**

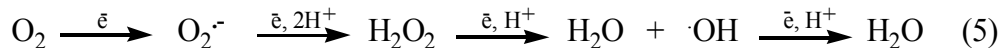
ROS canlı organizmalarda farklı yollarla oluşabilir (Şekil 2.1). Mitokondrial elektron transport zinciri, araşidonik asit metabolizması, geçiş metal iyonları, uyarılmış lökosit, aktive olmuş makrofajlar, endoplazmik retikulum, peroksizomlar, nötrofiller ve normal aerobik solunum endojen kaynaklardır. Sigara dumanı, iyonlaştırıcı radyasyon, çeşitli kirleticiler, organik çözücüler, yiyeceklerde bulunan bazı katkı maddeleri ve pestisitler de serbest radikallerin eksojen kaynaklarıdır.<sup>10,15-20</sup>



Şekil 2.1: ROS Kaynakları

### 2. 1. 6. 1. Mitokondrial elektron taşıma zinciri

En önemli endojen oksidant kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirindeki sızıntıdır. Memeliler hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondrial elektron transport sisteminde, oksijenin dört elektronunun su oluşturmak üzere indirgenmesiyle elde ederler.



Fakat bu süreçte oksijenin % 1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve ara ürün olarak serbest oksijen radikalleri oluşur. Bunların da çeşitli tepkimeleri ile ROS meydana gelir.<sup>21,22</sup> Mitokondri iç zarına yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikal üretimi artar.

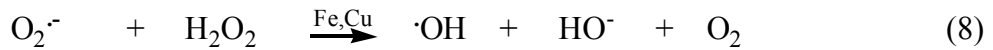
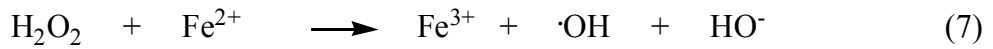
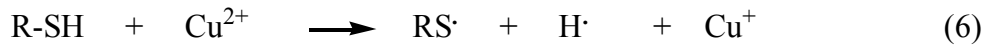


### 2. 1. 6. 2. Araşidonik asit metabolizması

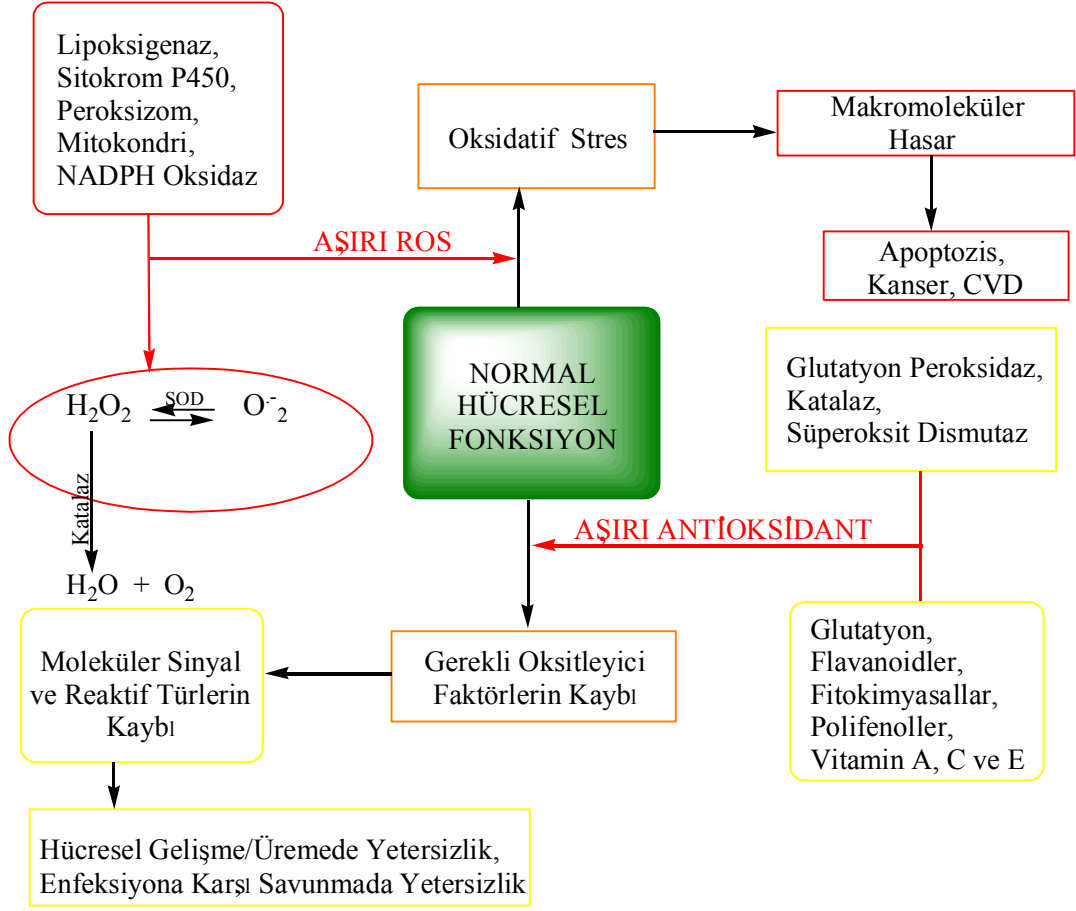
Araşidonik asit metabolizması da önemli ROS kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbest hale gelmesine yol açar. **Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu” denir.** Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbiriyle yakından ilişkilidir. Reaktif oksijen metabolitleri, fosfolipaz aktivasyonu yoluyla prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2</sub>, 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub> ve tromboksan B<sub>2</sub> sentezini sağlarlar. Prostaglandin E<sub>2</sub> ve I<sub>2</sub> (prostasiklin) de adenilat siklazı aktive ederek cAMP sentezini artırırılar.<sup>23</sup>

### 2. 1. 6. 3. Geçiş metal iyonları

Demir ve bakır iyonları başta olmak üzere geçiş metallerinin fizyolojik şartlarda gerçekleşen elektron alış-verişi şeklindeki tepkimeleri serbest radikal tepkimelerini katalizler. **Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den ·OH sentezini katalizler.**<sup>11</sup>



**Metal iyonlarının serbest radikal tepkimelerindeki önemi; lipid peroksidasyonunda sentezlenen lipid hidroperoksitlerini (LOOH) parçalamak ve lipid peroksidasyonunun zincir tepkimelerini katalizlemektir.**<sup>11</sup>



Şekil 2.2: Hücresel oksidatif etkileşimler.<sup>40</sup>

#### 2. 1. 6. 4. Fagositik solunum

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunum sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar.

Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin ( $O_2$ ) süperoksit radikaline indirgenmesi sonucu  $NADP^+$  üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktifleşir. Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan  $NADP^+$ 'nin diğer kaynağı hidrojen

peroksidin ( $H_2O_2$ ) detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir.<sup>23</sup>

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zararlarına karşı hassastır.

Nötrofillerden zehirli ajanların sızıntısı, yakın hücrelere ve sistemlere zarar verir.

### **2. 1. 6. 5. Eksojen oksidan kaynakları**

Eksojen bazı maddeler hücrelerde ya serbest radikal üretirler ya da antioksidant aktiviteyi düşürerek dolaylı olarak serbest radikal üretimini artırırlar. Bu tip maddeleri dört grupta toplayabiliriz:

1. Oksidan maddenin kendisi bir serbest radikaldir. Örneğin kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı ( $NO_2$ ) böyle bir maddedir ve lipid peroksidasyonunu başlatır.

2. Oksidan madde bir serbest radikale metabolize olur. Örneğin kuru temizlemede kullanılan karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ), karaciğerde sitokrom P450 tarafından triklorometil serbest radikale ( $CCl_3\cdot$ ) dönüştürülür. Bu da serbest oksijenle etkileşerek peroksil ( $CCl_3O_2\cdot$ ) serbest radikalini oluşturur. Böylece karaciğerde lipid peroksidasyonu başlar, hücre membranlarında oksidatif yıkım ve ciddi doku hasarı meydana gelir.

3. Oksidan maddenin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir.

4. Oksidan madde antioksidant aktiviteyi düşürür.<sup>23</sup>

## 2. 2. SERBEST RADİKALLERİN İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ

ROS normal olarak bütün aerobik hücrelerde biyokimyasal antioksidantlarla birlikte denge halinde bulunur. **Bu kritik dengenin bozulması, yani ROS derişiminin artması ve/veya antioksidant derişiminin azalması sonucu oksidatif stres meydana gelir.**<sup>4</sup> Oksijen radikalleri tarafından uyarılan oksidatif stres, ateroskleroz, gastrik ülser, inflamatuvar hasar, diyabet, genotoksisite, kardiyovasküler hastalıklar (CVD) ve kanser gibi çeşitli dejeneratif hastalıkların başlamasında ve/veya ilerlemesinde rol oynar.<sup>20</sup> Bu hastalıkların gelişimine neden olan moleküller; membranlardaki lipidler, DNA'daki nükleik asitler, proteinlerdeki sistein sülfidril grupları ve ribonükleoproteinlerdeki çapraz bağlardır. ROS; oksidatif çevrim, gen ekspresyonu ve inflammatuar yanıtta görev alırlar ve sağlıklı bir hücrede içsel bir kontrol altında tutulan moleküller hücre içi sinyal molekülleri gibi de davranırlar.<sup>4,24,25</sup> Şekil 2 hücresel antioksidant etkileşimleri göstermektedir.

ROS hem gıdaların bozulmasına neden olan lipid peroksidasyonunu hem de sitoplazma, mitokondri, hücre çekirdeği ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. **Bunun sonucu olarak membran geçirgenliği artar.** Malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi peroksidasyon ürünleri oluşur. Bunların sekonder oksidasyon ürünleri ise protein, amin ve deoksiribonükleik asit gibi biyolojik substratlarla etkileşir.<sup>20,26</sup>

### 2. 2. 1. Lipid Oksidasyonu

*In vitro* lipid oksidasyonu, oksidasyona duyarlı *n-3* ( $\omega-3$ ) ailesinde gerçekleşir. Gıda maddelerinin tadının ve besin değerinin (vitamin ve esansiyel yağ

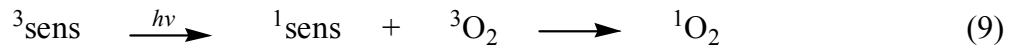
asitlerinin kaybı) değişmesiyle birlikte, yağların reaktif ve zehirli bileşiklere yükseltgenmesi tüketiciler için risk oluşturmaktadır.<sup>27-29</sup>

Isı, serbest radikaller, ışık, fotosentez pigmentleri, iyonlaştırıcı radyasyon ve metal iyonları oksijen varlığında lipid oksidasyonunu başlatır. Bu karışık reaksiyon üç farklı yol haritasına göre gerçekleşebilir.<sup>30</sup>

Bunlar:

1. Serbest radikallerin neden olduğu enzimatik olmayan zincir otooksidasyonu
2. Enzimatik ve radikalik olmayan fotooksidasyon
3. Enzimatik oksidasyon

Serbest radikallerin neden olduğu enzimatik olmayan zincir otooksidasyonu ile enzimatik ve radikalik olmayan fotooksidasyon triplet oksijen (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) ve singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) tepkimelerinden oluşur. (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)'nin birçok kaynağı vardır, fakat fotosentez pigmentleri varlığında genelde UV fotonik çarpışma ile oluşur.<sup>30</sup>



Reaksiyon 9'da bir triplet fotosentez pigmenti (<sup>3</sup>sens) foton absorblar ve singlet haline gelir, daha sonra kendi enerjisini moleküler oksijene ileterek triplet oksijen oluşturulur. Bu da uyarılarak ve triplet oksijenden yaklaşık 1500 kat daha reaktif olan singlet oksijeni oluşturur. Oluşan singlet oksijen elektrofiliktir, C=C çift bağına direk olarak bağlanarak hidroperoksit oluşumunu başlatır.<sup>31</sup> Bu tepkimenin serbest radikallere parçalanmış hidroperoksitleri oluşturduğu kabul edilir. Bu durumda

hidroperoksit ve uçucu bileşikler üç fazlı bir süreçte (Başlangıç, Yayılma, Sonlanma) (Şekil 2.3) meydana gelir.<sup>30</sup>

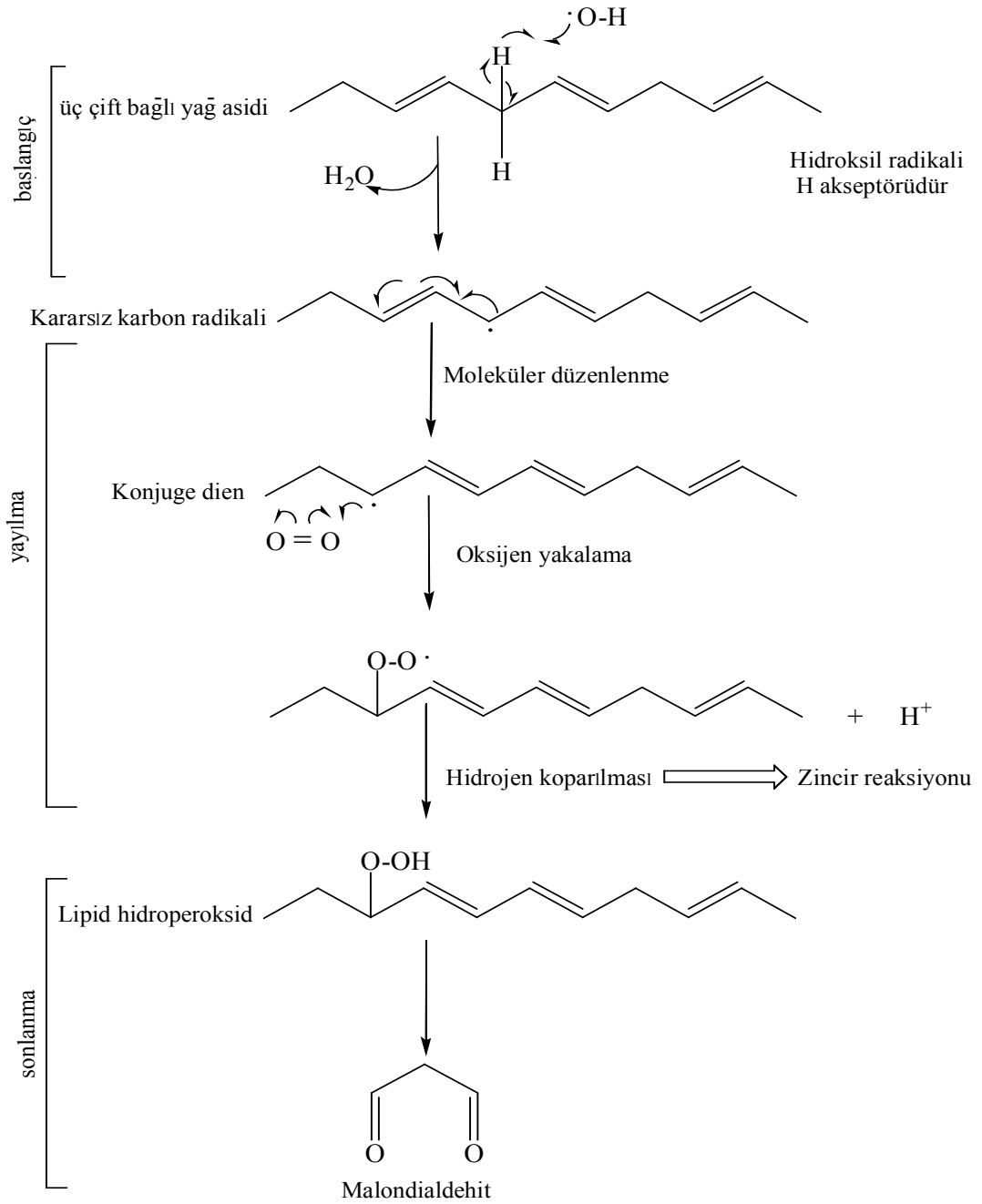
### **2. 2. 1. 1. Başlangıç**

Başlangıç fazı yağ asidi zincirinin (LH) çift bağına  $\alpha$  pozisyonunda bağlı olan hidrojenin homolitik kırılmasıdır.<sup>32</sup> Tepkime, hem eksternal fiziksel etkenler (sıcaklık, radyasyon, ultraviyole spektrumunda fotonik çarpışma) vasıtasıyla hem de metal iyonları, serbest radikaller ve metaloproteinlerle başlayabilir. Başlangıç fazını tanımlamak zordur, çünkü bu fazda radikaller düşük derişimdedir ve lipid radikalleri birden fazla basamak üzerinden oluşur. Bu radikaller; oldukça kararsız olup başka moleküllerden bir hidrojen koparma yoluyla dengelenen kısa ömürlü ara ürünlerdir. Başlangıç fazının sonunda, oksidasyon aniden hızlanır, oksijen tüketimi artar ve peroksit içeriği oldukça yükselir. Lipid oksidasyonunda ilk olarak hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) ve hidroperoksil ( $\text{HOO}\cdot$ ) radikalleriyle birlikte lipid alkoksil ( $\text{LO}\cdot$ ) ve lipid peroksil ( $\text{LOO}\cdot$ ) radikalleri oluşur.<sup>30</sup>

### **2. 2. 1. 2. Yayılma**

Oksijenli ortamda  $\text{L}\cdot$  radikali (lipid radikali) karbon atomu üzerindedir ve başlangıç evresi sırasında oluşmuştur. Peroksi radikallerini ( $\text{LOO}\cdot$ ) de kapsayan farklı radikal türlerini meydana getirmek için triplet oksijen ile hemen etkileşir.<sup>32</sup> Peroksi radikali bundan sonra, hidroperoksit (primer oksidasyon bileşiği) ve başka radikal oluşturmak için, doymamış başka bir lipid molekülünden bir hidrojen atomu koparır, böylece kendi kendine oluşan radikal zincir tepkimesi meydana gelir. Radikal başlatıcı oksidasyondan sonra yayılma evresi sırasında yaklaşık 25 yağ asidi

molekölü yükseltgenir.<sup>33</sup> Doymamış yağ asitlerinden hidroperoksit oluşumu genel olarak konjuge dien ve trienleri meydana getiren elektron delokalizasyonu ile radikal hali dengeler.



Şekil 2.3: Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyon zinciri.<sup>35</sup>

### **2. 2. 1. 3. Sonlanma**

Sonlanma fazının başında maksimum düzeyde peroksit oluşur. Oksidasyon süreci hidroperoksitlerin radikal olmayan sekonder oksidasyon bileşiklerine dönüşümüyle devam eder. Temel hidroperoksit parçalanma mekanizması hidrokarbon, aldehit, alkol ve uçucu ketonların oluşumunu başlatmak için hidroksil grubuna bitişik çift bağın kırılmasını kapsar. Aynı zamanda uçucu olmayan aldehitler, oksitlenmiş triaçilgliseroller ve bunların polimerlerini de içine alan sekonder metabolitler oluşur. Primer oksidasyon bileşiklerinin ayrışması tek bir hidroperoksitten uçucu veya uçucu olmayan moleküllerin çeşitli türlerinin meydana gelebildiği karışık bir mekanizmadır.<sup>30</sup>

### **2. 2. 2. Protein Oksidasyonu**

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir.<sup>4</sup> Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları; enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitesinin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör vasıtasıyla endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir.<sup>8,21,34</sup>

### **2. 2. 3. Karbohidrat Oksidasyonu**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir ve bunlar çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.<sup>6</sup>



#### 2. 2. 4. DNA Oksidasyonu

Hidroksil radikalinin DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları, şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. İleri derecedeki DNA hasarları hücre ölümüne neden olur. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır.<sup>8,9</sup>

#### 2. 3. ANTIOKSİDANT MEKANİZMALAR

Antioksidant aktivite farklı şekillerde ifade edilir, örneğin; prooksidant enzim inhibisyonu, singlet oksijen deaktivasyonu, UV filtrasyonu, ROS'nin enzimatik detoksifikasyonu, geçiş metallerinin şelatlaması bunlara ek olarak hidrojen radikali aracılığı ile ROS stablizasyonu.<sup>30</sup> Antioksidasyonu tanımlamak için de farklı stratejiler kabul edilir. Halliwell ve Gutteridge antioksidantı “düşük konsantrasyonlarda bulunduğu oksitlenebilen bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen bir madde” olarak tanımlarlar.<sup>30,36</sup> Bu tanımlamaya göre, substrat içermeyen bir metod antioksidant aktiviteyi ölçemez.

Antioksidantlar oksidasyonu iki farklı yoldan engeller. Bunlar; hedef lipidleri oksidasyon başlatıcılardan korumak ve yayılma fazını durdurmaaktır. İlk durumda, koruyucu antioksidantlar ROS oluşumunu engeller veya oksidasyonu başlatmak için gerekli türleri ( $O_2^-$ ,  $^1O_2$ , vb) söndürürler. İkinci durumda, “zincir kıran” antioksidantlar radikal oksidasyon yayıcıları ( $LOO\cdot$ ) tutarlar veya radikal zincir yayılmasını durdurmada dolaylı olarak rol alırlar.<sup>30</sup>

Antioksidantlar çoğu kez karışık mekanizmalar aracılığıyla antioksidasyon olayında rol alırlar. Başlıca antioksidant mekanizmalar aşağıda ele alınmıştır.

### **2. 3. 1. Önleyici Antioksidantlar**

Önleyici olarak işlev gören sekonder antioksidantlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar.<sup>37</sup> Farklı önleyici antioksidasyon çeşitleri vardır. Bunlar; geçiş metallerinin şelasyonu, singlet oksijen deaktivasyonu, enzimatik ROS detoksifikasyonu, UV filtrasyonu, prooksidant enzimlerin inhibisyonu, antioksidant enzim kofaktörlerinin işlevsel sonuçları, vb'dir.<sup>30</sup> En çok bilinenler şunlardır:

#### **2. 3. 1. 1. Metal şelatlayıcılar**

Geçiş metal şelatlayıcılar bakır ve demir gibi geçiş metal iyonları ile kompleks veya koordinasyon bileşikleri oluşturarak (Fenton tipi reaksiyonları inhibe ederek<sup>37</sup>) oksidasyonu önlerler. Albumin, seruloplasmin, transferin, ferritin ve laktalbumin gibi proteinler ile polifosfatlar, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sitrik asit, fenolik asitler ve flavonoidler geçiş metallerini şelatlama kapasitesine sahiptir.<sup>30</sup>

#### **2. 3. 1. 2. Singlet oksijen söndürücüler**

Karotenoidler; zincir kırıcı antioksidantlar ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) söndürücülere benzer mekanizmalar aracılığıyla antioksidant aktivite gösterirler. Her bir karotenoid molekülünün yaklaşık 1000  $^1O_2$  molekülünü söndürdüğü tahmin edilmektedir.<sup>30</sup>

Karotenoidler dışında özellikle tokoferoller ve tiyoller  $^1O_2$  söndürürler.<sup>38</sup>

### 2. 3. 1. 3. ROS detoksifikasyonu

ROS detoksifikasyonu, endojen enzimatik antioksidant sistemler aracılığıyla oksidasyonun önemli derecede önlenmesidir.<sup>30</sup>

### 2. 3. 2. Zincir-kıran Antioksidantlar

Lipid peroksidasyonunda, zincir-kıran antioksidantlar genellikle bir hidrojen radikalini LOO<sup>•</sup> (lipid peroksit)'e verirler, böylece radikalın oksidasyon yayılımını durdururlar.<sup>30</sup> Bu aslında, bir veya birkaç aromatik halkada farklı süstitüentler bulunan mono- veya poli-hidroksillenmiş fenol bileşiklerinden ( tokoferoller, tokotrienoller, flavonoidler, fenolik asitler ve alkoller, stilbenzenler, vb.) oluşur. Bir fenolün bir H atomunu verme kapasitesi O-H bağının homolitik ayrışma enerjisi ile ölçülebilir (Bağ Ayrışma Enerjisi: BDE). Fenolün BDE düşük ise bir H atomunu verme kapasitesi artar. Bu, zincir kırıcı özelliği yöneten tek faktör değildir, bu özellik multifaktoriyel kontrol altındadır. Uygun bir pozisyon ve LOO<sup>•</sup> oluşum yerlerine doğru uygun yaklaşım bir antioksidantın iyi bir zincir kırıcı olmasını sağlayan anahtar özelliklerdir. Sonuç olarak, zincir kırıcı özellik doymamış lipidlerle antioksidant türevli radikallerin reaktivitelerine bağlı olarak değerlendirilmektedir. Bu da genellikle delokalizasyon ile ortaklanmamış elektronları sabitleyen antioksidantın kapasitesiyle belirtilir. Bu açıdan bakılınca, aromatik yapı ve hacimli grupların varlığı bu delokalizasyonu devam ettirebilir, fenol radikallerinin kararlılığını artırır. *In vivo* yenileme sistemleri aynı zamanda tokoferoksi gibi radikal formların indirgenmesini kontrol eder.<sup>30</sup>

### **2. 3. 3. Prooksidant Etkiler**

Günümüzde, flavonoidlerin  $\text{Cu}^{+2}$  varlığında prooksidant aktiviteye sahip olduğu kabul edilir.<sup>39</sup> Benzer yapısal dokuya sahip flavonoidlerin 37°C'deki sulu çözeltisinin bir bitkisel proteine ( $\beta$ -phycoerythrin) karşı prooksidant aktiviteleri aromatik hidroksillerin sayısı ile artar. Ancak,  $\text{Cu}^{+2}$  varlığındaki oksidant flavonoidlerin bir çoğu: (i) bir peroksiradikal başlatıcıdır ( $\text{Cu}^{+2}$  yokluğunda) veya (ii) hidroksil radikallerini oluşturan Fenton tipi bir sistem ( $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) varlığında daha fazla antioksidant aktivite gösterir.<sup>30</sup>

## **2. 4. RADİKALLERİN NEDEN OLDUĞU HASARLAR**

### **2. 4. 1. Hastalıklarda Reaktif Oksijen Türlerinin Etkisi**

Reaktif oksijen türleri birçok hastalığın patogenezisinde rol almaktadır. Bu hastalıklar üç ana grupta toplanabilir:

1. Genetiğe bağlı hastalıklar (Fanconi anemisi, bloom sendromu)
2. Çevresel etkenlerle oluşan hastalıklar (iş hastalıkları, zehirlenmeler, virüs ve bakteriyel enfeksiyonlar)
3. Hem genetik hem de çevresel etkenlerle oluşan hastalıklar (bronşiyal astım, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar (CVD) ve diğerleri)

Serbest radikallerin rol aldığı hastalıklarla ilgili durumlar ise; inflamasyon, oksijen ve diğer gazların zehir etkileri, yaşlanma, radyasyon, damar sertliği ve DNA hasarlarıdır. Bu durumlarda ROS oluşumu veya detoksifikasyonunda denge bozulmuştur. Bu hastalıklardan olan kanser ve CVD'da ROS etkisi ve antioksidantların bu hastalıkları önlemede veya tedavi etmede etkili olup olmadığı çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Reaktif oksijen türlerinin spesifik moleküler

etkilerinin CVD ve kanserin çeşitli risk faktörlerinde bilinmesi bunların tedavisinde antioksidantların etkisinin araştırılmasını önemli kılmaktadır.<sup>40</sup>

#### **2. 4. 2. Karsinogenezis ve Kanser Nedenleri**

Kanser, değişik genetik lezyonlarla tanımlanan çok sayıda farklı hastalıklar olarak tanımlanabilir. Hanahan ve Weinberg<sup>40,41</sup> tümöre neden olan özel sebepleri belirtmişler. Bunlar; 1) Büyüme sinyallerinde aşırılık, 2) Antibüyüme sinyallerine karşı duyarsızlık, 3) Apoptozis (hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre intihar mekanizması) saldırısı, 4) Sınırsız yenilenme potansiyeli, 5) Uzun süreli anjiyogenezis (önceden var olan damarlardan yeni damarların yapımı), 6) Doku çoğalması ve metastazdır.<sup>42</sup> ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) bu süreçlere katılarak kanser gelişmesine katkıda bulunurlar, fakat aynı zamanda değişmiş hücrelerin yayılmasını kontrol etmek ve bu hücreleri elimine etmeye çalışarak endojen savunmalarda önemli rol alırlar. ROS'nin hem hasar verici hem de koruyucu özelliklerinin daha iyi anlaşılması, son zamanlarda antioksidant takviyesi alan kanser hastalarının sayısının artmasına neden olmuş ve buna bağlı olarak kanser tedavisinde yeni ufuklar açmıştır. Ancak, insanlarda kanseri önlemede ve tedavi etmede ROS/RNS'nin etkisinin nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir.<sup>40</sup>

#### **2. 4. 3. Kanserde ROS Dengesi**

Bazı araştırmacılar kanser hücrelerinde artan ROS üretiminin disfonksiyonel ROS kaynaklarına ve/veya detoksifiye edicilere bağlı olduğunu bildirmektedir. ROS/RNS düzeylerinin anormal değerlerinin karsinogeneziste rol aldığına

inanılmaktadır. Hidrojen peroksit düzeylerinin tümör hücrelerinde anormal şekilde yükseldiği<sup>43</sup>, diğer hücrelerde ise katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum, hidrojen peroksit detoksifikasyonundaki yetersizlikten kaynaklanmaktadır.<sup>44</sup>

Reaktif oksijen türlerinin kanserin başlangıcında, gelişmesinde ve metastazında birçok etkisinin olduğu, kanser tedavisi ve önlenmesinde antioksidant kullanımının etkisini araştıran klinik çalışmalarda belirtilmektedir. Hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlamak için ROS seviyesinin düzenlenmesi gerekir. **Aşırı antioksidant tüketimi de bu dengeyi bozup istenmeyen etkilerin meydana gelmesine neden olabilir.** Bazı kemoterapi ilaçları ve radyoterapi yüksek seviyede ROS üreterek kanser hücrelerini öldürür, bundan dolayı antioksidant kullanımı bazı kanser tedavilerini engelleyebilir. Bununla birlikte bazı sonuçlar antioksidant kullanımının kemoterapide yan etkileri engellediğini ve uzun süreli tedaviyi gerektirdiğini göstermiştir.<sup>45</sup>

#### **2. 4. 4. Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz**

Yükseltgenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) ateroskleroz plaklarının oluşumunda önemli bir etkidir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) plazmada kolesterol taşır ve dolaşımında yüksek seviyede bulunması ateroskleroz riskini azaltır. Erkeklerde yüksek seviyede oxLDL yüksek tansiyona neden olur. Vasküler travma hem hücre içi hem de hücre dışı ROS seviyesini anormal şekilde yükseltir, özellikle hiperlipidemi durumlarında yağ asidi ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Yükseltgenmiş lipidler hücre membranında birikerek, plasmolemma sızıntısına neden olarak ve membran reseptörlerinin fonksiyonlarına etki ederek

hücre fonksiyonunu etkiler. Bunlara ek olarak lipid peroksidasyonunun yan ürünleri olan doymamış aldehytler ve diğer metabolitler sitotoksik ve mutajenik özelliklere sahiptir. oxLDL ateroskleroz patogenezisinde özel role sahiptir.<sup>40,46-49</sup>

#### **2. 4. 5. Apoptotik (Proglamlanmış Hücre Ölümü) Yanıt**

ROS vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) ve endotelyal hücrelerde gelişmeyi destekleme etkisine sahiptirler, ROS ayrıca, büyümeyi bastırabilir ve/veya apoptozise neden olabilir. Tümör baskılayıcı p53'ün artmış aktivitesi VSMC'de ROS seviyesinin artmasına neden olur, bu durumda büyüme engellenir veya apoptozis meydana gelir.<sup>50</sup> Hücrelerin ROS'ni bir proliferatif sinyal ve büyüme inhibitörü veya apoptotik yanıt gibi birbirinden ayırtedebilmeleri hem ROS'nin ortamdaki dozajına hem de dayanıklılığına bağlıdır. Vasküler beyaz kas hücrelerinin kısa süreli düşük oksidatif strese maruz kalması durumunda büyümeye olumlu etki yaparken uzun süreli maruz kalınca hücre ölümüne neden olur. Bu durum hücrelerin ROS'ne karşı detoksifiye ve savunma refleksidir.<sup>40</sup>

#### **2. 4. 6. Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi**

Yaşlanmada serbest radikal teorisi ilk defa Dr. Denham Harman<sup>51</sup> tarafından önerilmiştir. Bu teoriye göre; serbest radikaller olarak bilinen oldukça reaktif moleküller tarafından vücutta başlatılan tepkimeler sonucu oluşan değişikliklerin birikimi sonucu yaşlanma oluşur. **Serbest radikallerin neden olduğu değişiklikler yaşlanmanın, hastalık oluşmasının veya ölümün en önemli nedeni olduğu kabul edilir.** Bu teoriye göre; serbest radikaller ve bunların öncülleri endojen olarak normal metabolik süreçlerde veya eksojen olarak sigara dumanı gibi nedenlerden oluşur.

Buna göre; yaşlılık ve yaşa bağlı hastalıklara neden olan hasarlar diyetin ayarlanmasıyla minimuma indirgenebilir. Ayrıca, serbest radikal tepkimelerinin yaşa bağlı olarak kardiovasküler ve sinir sisteminde önemli bozulmalara neden olduğu kabul edilir.<sup>51</sup>

## **2. 5. METABOLİK RADİKAL SÖNDÜRÜCÜLER**

ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarları önlemek için savunma sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar antioksidant savunma sistemleri veya antioksidantlar olarak bilinir.

Antioksidantları aktivitelerine göre iki gruba ayırabiliriz; oksidasyon önleyiciler ve oksidasyon durdurucular. İlk durumda, koruyucu antioksidantlar ROS oluşumunu engeller veya oksidasyonu başlatmak için gerekli türleri ( $O_2^-$ ,  $^1O_2$ , vb) söndürürler. İkinci durumda, “zincir kırıcı” antioksidantlar radikal oksidasyon yayıcıları ( $LOO\cdot$ ) tutarlar veya radikal zincir reaksiyonlarının yayılmasını durdurmada dolaylı olarak rol alırlar.<sup>30</sup>

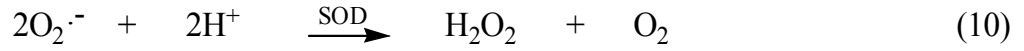
İnsan organizmasında bulunan antioksidant sistemler, endojen antioksidantlar ve ekzojen antioksidantlar olarak sınıflandırılabilir.<sup>30</sup>

### **2. 5. 1. Endojen Antioksidantlar**

#### **2. 5. 1. 1. Enzimatik antioksidantlar**

**Süperoksit dismutaz (SOD):** Süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen perokside parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir (Reaksiyon 10). SOD enzimleri ökaryotik organizmalarda hücreler arası sıvılarda bulunur. Bu enzimler bakır, çinko, manganez veya demir gibi metal iyon kofaktörlerine sahiptir.<sup>30</sup>

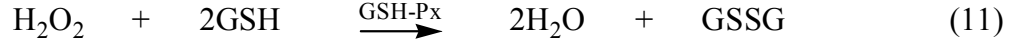




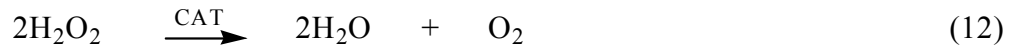
**Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):** Üç reaktif türle ilgili detoksifikasyon aktivitesine sahiptir;

1. Hidrojen peroksit,
2. Lipid hidroperoksitleri,
3. Peroksinitrit.

GSH-Px, enziminin aktif merkezinde selenosistein formunda dört selenyum atomu bulunur. Bu enzim, glutasyonun hidrojen peroksit ile oksidasyonunu katalizleyerek,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi suya indirger (peptidik tiyol, GSH olarak gösterilmiştir)<sup>30</sup> (Reaksiyon 11).



**Katalaz (CAT):** Demir veya manganez kofaktörlerini kullanarak hidrojen peroksidin su ve oksijene dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir (Reaksiyon 12). Bu heminik (Fe atomu bağlı) enzim çoğunlukla peroksizom ve eritrositlerde bulunur.



*In vivo*'da enzimatik antioksidantlar arasında direk işbirliği vardır. Süperoksit anyonlarını dismutasyona uğratan SOD, sıra ile katalaz ve/veya GSH-Px sistemleri tarafından detoksifiye olan hidrojen peroksit oluşumunu başlatır.<sup>30</sup>

**Glutasyon S-Transferazlar (GST):** Glutasyon S-Transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı selenyuma gereksinim duymadan GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidant savunma mekanizması oluştururlar. Bu enzimler hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler.<sup>23</sup>

**Mitokondriyal sitokrom oksidaz:** Solunum sisteminin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder.



Reaksiyon 13; fizyolojik şartlarda meydana gelen normal bir reaksiyondur, bol miktarda ATP üretimi sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve diğer antioksidant enzimler süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.<sup>23</sup>

### 2. 5. 1. 2. Enzimatik olmayan antioksidantlar

**Glutasyon (GSH):** Karaciğerde sentezlenen bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Proteinlerdeki sülfhidril gruplarını (-SH) oksidasyona karşı korur, böylece -SH fonksiyonel grupları taşıyan proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan

transportunu sağlar. Ayrıca eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korur.<sup>23</sup>

**Melatonin (MLT):** Günümüze kadar bilinen antioksidantların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Hidroksil serbest radikalini ortadan kaldırır. Melatonin lipofiliktir, bundan dolayı hücrenin birçok organeline ve hücre çekirdeğine ulaşabilir ve böylece birçok organda antioksidan aktivite gösterir.

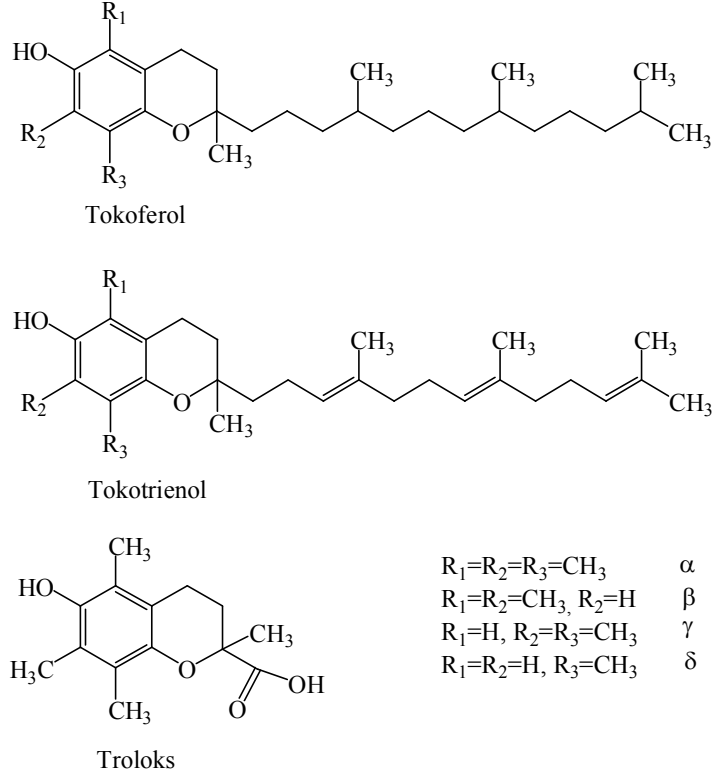
Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi de azalır ki bunun da yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklarda önemli rolü vardır.<sup>23</sup>

Ayrıca bilirubin, östrojenik eşey hormonları, ürik asit, koenzim Q, melanin, ve lipoik asit de önemli endojen enzimatik olmayan antioksidantlardır.

**Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol):** Güçlü bir antioksidantdır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden korur. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger, zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincirleme tepkimesi, vitamin E vasıtasıyla sonlandırılabilir.

Vitamin E yükseltgendikten sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. **Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller.**

Vitamin E selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.<sup>23</sup>



**Şekil 2.4:** Tokoferol, Tokotrienol ve Troloks kimyasal yapısı.<sup>30</sup>

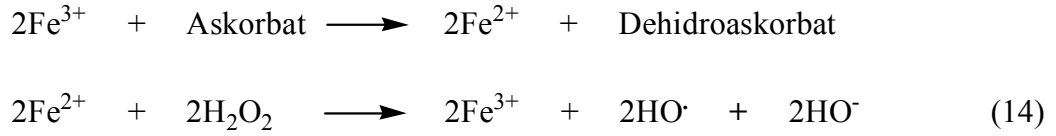
## 2. 5. 2. Eksojen Antioksidantlar

### 2. 5. 2. 1. Vitaminler

**Askorbik Asit (Vitamin C):** Doğal bir antioksidantdır. Bir şeker asidi laktonudur. Birçok hayvan ve bitki askorbik asidi glukozdan ve diğer basit öncülerden sentezleyebilir. Mikroorganizmalarda yoktur, insan ve diğer omurgalılar için esansiyeldir.<sup>52</sup> Askorbik asit, indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidantdır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları indirger.

Askorbik asit antioksidant etkisinin yanında oksidant etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı  $Fe^{3+}$ 'ü ya uzaklaştırır ya da Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileştirerek indirger ve  $Fe^{+2}$ 'ye dönüştürerek hidroksil radikali oluşturmaya uygun hale getirir (Reaksiyon 14). Bu özelliğinden dolayı serbest

radikal reaksiyonlarında katalizör veya prooksidan etki gösterir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidandır.<sup>35</sup>



**Karotenoidler:** Karotenoidlerin antioksidan özellikleri, izopren birimlerinin kuyruk kuyruğa bağlanması sonucu oluşan ve konjuge durumlarda çok sayıda çift bağ içeren tetraterpen yapısından kaynaklanmaktadır.<sup>53,54</sup>

Karotenoidlerden olan likopen, oksidatif hasarları engelleyerek yağ asidi oksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyini düşürür, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi endojen antioksidanların aktivitelerini ise artırır.<sup>53,55,56</sup>

Ayrıca,  $\alpha$ -tokoferol ve folik asit de önemli eksojen antioksidant vitaminlerdir.

### 1. 5. 2. 2. İlaçlar

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidantları şöyle sıralayabiliriz: 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri. 2) NADPH oksidaz inhibitörleri. 3) Rekombinant süperoksit dismutaz. 4) Trolox-C (vitamin E analogu). 5) Endojen antioksidant aktiviteyi arttıranlar. 6) Enzimatik olmayan serbest radikal söndürücüler (mannitol, albümin). 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri. 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri. 9) Sitokinler. 10) Barbitüratlar. 11) Demir şelatlayıcılar.<sup>23</sup>

### **2. 5. 2. 3. Gıdalarda kullanılan eksojen antioksidantlar**

Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), Sodyum benzoate, Ethoxyquin ve Propylgalat en sık kullanılanlardır.<sup>23</sup>

## **2. 6. ŞIFALI BİTKİLER**

### **2. 6. 1. Bitkilerin Tedavideki Yeri**

İlaç tarihinin son 2.000 yıllık döneminin büyük bölümünde insanoğlu sadece taze veya kurutulmuş bitkisel ilaç kaynağı kullanmıştır. 248.000'den fazla bitki türü teşhis edilmiştir ve bunlardan 12.000 tanesinin şifalı özellikleri bilinmektedir. Ancak, bütün bitkilerin % 10'dan azı fito-kimyasal ve/veya farmakolojik açıdan araştırılmıştır.<sup>57</sup> Tedavi edici olarak kullanılan; alkaloidler, çeşitli kalp glikozidleri, bitkisel steroidler, bitkisel vitaminler ile flavonoidler ve antibiyotiklerin büyük bölümü bunlardan izole edilmiştir.<sup>58</sup> Sentetik aspirin 100 yıldan daha uzun süreden beri kullanılmakla birlikte etkin maddesinin söğüt ağacının kabuğunda bulunduğu tespit edilmiştir.<sup>59</sup>

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 1994 yılı verilerinde, dünya nüfusunun % 90'nın tedavi için şifalı bitki kullandığı ve % 81'nin sentetik ilaçlara ulaşma imkanının olmadığı bildirilmektedir. Bu durum Asya, Afrika ve Güney Amerika'da daha az gelişmiş ülkeler için şanssızlıktır. Bu verilerden dünyanın birçok bölgesinde bitkisel ilaçların tedavi edici özellik taşıdığı, ancak bunların gelişmiş ülkelerde yeterince değerlendirilmediği anlaşılmaktadır.<sup>60</sup>

Sentetik ilaçlarıyla tanınan ilaç şirketi Bayer AG Pharma Research doğal kökenli bileşikler üzerine araştırmanın ve şifalı bitki incelemenin önemini onaylayıp 1999 verilerinde özet olarak şöyle bildirmiştir, “muhtemel yeni ilaçların % 40'nı

sadece 90.000 doğal bileşik oluştururken, geriye kalan % 60'nı birkaç milyon sentetik bileşik oluşturur".<sup>61</sup>

Gelişmiş ülkelerde reçete edilen ilaçların % 35'nin doğal kaynaklı olması ve OTC ilaçlarının % 50'nin bitkisel kaynaklı olması şifalı bitkilerin önemini açıklamaktadır. Batı Avrupa'da son 10 yılda şifalı bitki tüketimi ikiye katlanmıştır.<sup>60</sup>

### 2. 6. 2. Bitkisel Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler bitkiler tarafından üretilen ve günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler (protein, lipid, karbohidrat) kadar önemli olan kimyasal maddelerdir. Bitkiler; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek için sekonder metabolitler üretirler. Günümüzde 100.000'i aşan sekonder metabolit çeşidi teşhis edilmiştir. Bunları üç önemli kimyasal sınıfta incelemek mümkündür; **terpenler** (lipidlerin bir grubu), **fenolikler** (karbohidratlardan türemiş) ve **alkoloidler** (amino asitlerden türemiş). Potansiyel antikanser ilaç olan taksol bir terpendir. Taksol pasifik porsuk ağacından elde edilen bir diterpendir. Fitoaleksin, resveratrol (kırmızı üzümde bulunan antioksidant madde) antikanser ajandır ve fenoliklere örnektir. Çaydaki tanen, meyveler ve kırmızı şarap insan sağlığını olumlu yönde etkileyen flavonoidlerdir. Alkoloid olarak bilinen ve ilaç olarak kullanılan bitkisel sekonder metabolitlerin büyük bir sınıfı hücre membranlarına bağlanarak hayvanlarda farmakolojik etkiler gösterirler. Ticari açıdan önemli olan ve insanlar tarafından kullanılan nikotin fizyolojik bağımlılık yapan alkoloiddir. Kahvedeki kafein alkoloidi, çay ve çikolatadaki alkaloidler merkezi sinir

sistemini uyarıp hafif diüretik etki gösterirler. Opium bitkisi 25'in üzerinde alkaloid içerir, morfin bunların en fazla olanıdır ve en potansiyel ağrı kesicidir. Cezayir menekşesinden elde edilen vincristine ve vinblastine alkaloidleri hodgking hastalığı ve diğer lenfomalarda kullanılan güçlü antitümörlerdir.<sup>62</sup>

Sekonder metabolitler pozitif sağlık etkisi oluşturan bilindik biyolojik etki göstermelerinden dolayı ilgi çekmektedir. Bunlar; antibakteriyal, antifungal ve antioksidant etkilerdir. Sekonder metabolitler ilaç hammaddesi olarak, besin katkı maddesi olarak, zirai ilaç olarak ve kozmetik sektöründe kullanılırlar. Bitki ekstraktları ve izole edilmiş sekonder metabolitlerinin dünya pazarında yıllık 10 milyar US dolarını aşan payı vardır. Bitki sekonder metabolitlerinin değeri; sağlığı korumadaki etkilerine yönelik bileşiklerin her geçen gün artması ve yeni ilaç geliştirmekte öncül kimyasal madde olma özelliğine bağlı olarak artmaktadır.<sup>62</sup>

Sekonder metabolitler genelde kuru bitki ağırlığının % 1-3 oluşturur. Özel hücrelerde farklı gelişim evrelerinde sentezlenirler, sahip oldukları karışık yapı ekstraksiyon ve saflaştırılmalarını zorlaştırır.<sup>62</sup>

Bitkilerin sekonder metabolitleri üç önemli faktörden etkilenir; **soyaçekim** (genetik kompozisyon), **ontogeni** (gelişim evresi) ve **çevre** (örn: iklim ortak flora, toprak, ekim metodu). Genetik kompozisyon hem kalitatif hem de kantitatif değişiklikleri kapsamaktadır, fakat ontogeni ve çevresel etkilerle oluşan değişiklikler kantitatifdir.<sup>59,63</sup>

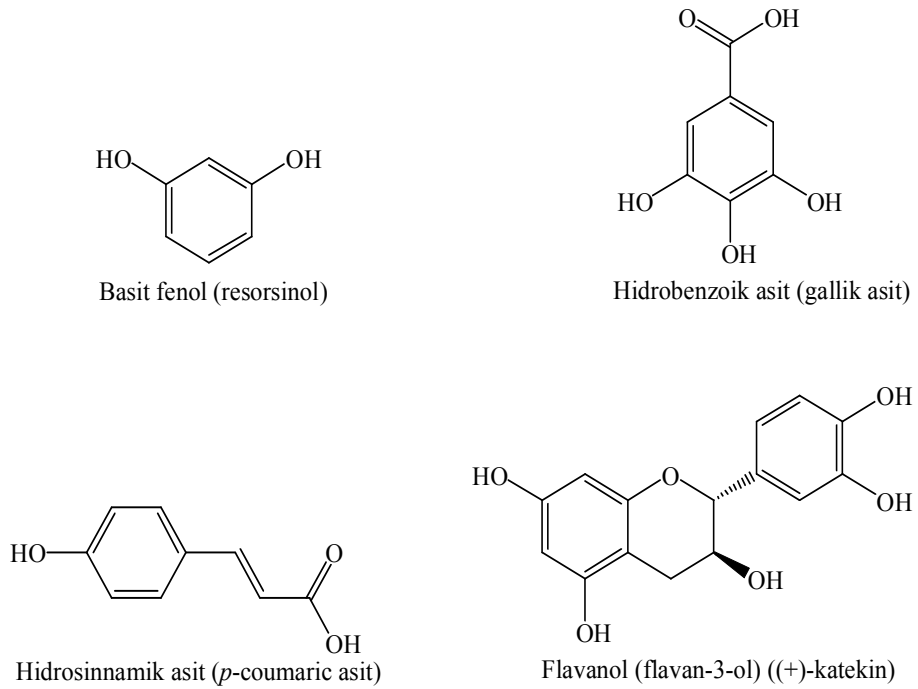
### **2. 6. 2. 1. Bitkilerin önemli antioksidant bileşenleri**

**2. 6. 2. 1. 1. Fenolik Bileşikler:** Bitki polifenollerini hidrosillenmiş aromatik bileşiklerdir, yaygın olarak diyetimizin önemli bir bölümünü oluştururlar. Sebze,



meyve ve birçok besin kaynaklarında bulunan, en etkili ve terapötik olarak en yararlı biyoaktif maddelerdir. Fenolik türevler; sekonder bitki metabolitlerinin en geniş sınıfını oluştururlar.<sup>64,65</sup> Fenolik bileşiklerin antioksidant aktivitesi, çoğunlukla redoks özelliklerine bağlıdır.<sup>66</sup> Aromatik halkaya bağlı –OH grubu bulunan fenoller, etkili antioksidantlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir, bu nedenle diğer radikallere göre etkin değildirler.<sup>20</sup> Bu bileşikler, serbest radikalleri, singlet ve triplet oksijeni söndürebilirler ve peroksitleri bileşenlerine ayırabilirler.<sup>66</sup> Fenolik antioksidantların önemi, serbest radikal sonlandırıcı ve metal şelatlayıcı olmalarından kaynaklanmaktadır.<sup>20</sup>

Doğal olarak bulunan 8.000 üzerinde fenolik bileşik bilinmektedir. Bu bileşikler diğer substituentlere ek olarak bir veya daha fazla bağlanmış –OH grubu bulunan en az bir aromatik halka içermektedirler<sup>67</sup> ve onbeş ana yapısal sınıfa ayrılabilirler.<sup>68</sup> Şekil 2.5 bitkisel bazı fenolik bileşiklerini göstermektedir.



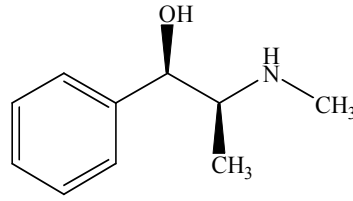
**Şekil 2.5:** Bitkisel Fenolik Bileşikler.<sup>64</sup>

**2. 6. 2. 1. 2. Karotenoidler:** Singlet oksijeni ( $^1O_2$ ) söndürmek için en etkili moleküllerdir. Evrende 600 civarında karotenoid doğal olarak bulunur, çoğu 40 karbon atomuna sahiptir. Bunlar karotenler (lycopene,  $\beta$ -carotene, vb.) gibi saf hidrokarbonlar olabilir veya ksantofiller (astaxanthin, lutein, vb.) gibi oksijenlenmiş bir fonksiyonel grup içerebilirler.<sup>69</sup>

**2. 6. 2. 1. 3. Taninler:** Bitkilerin polifenolik metabolitleri olarak bilinirler, 500'den büyük molekül ağırlıkları ve jelatin ile diğer proteinleri çözeltiden çöktürme yetenekleri vardır.<sup>70</sup>  $FeCl_3$  ile mavi renk oluşturmak gibi tipik fenol reaksiyonları gösterirler.<sup>71</sup> Taninler, hidrolizlenebilen tanin ve kondense tanin alt gruplarına ayrılabilir. Hidrolizlenebilen taninler gallik asit esterleri (gallo- ve ellagi- taninler), kondense taninler polihidroksi flavan-3-oller'dir, aynı zamanda proantasiyanidinler olarak da bilinirler.<sup>72</sup> Tanin "*tannik asit*" olarak da bilinir.

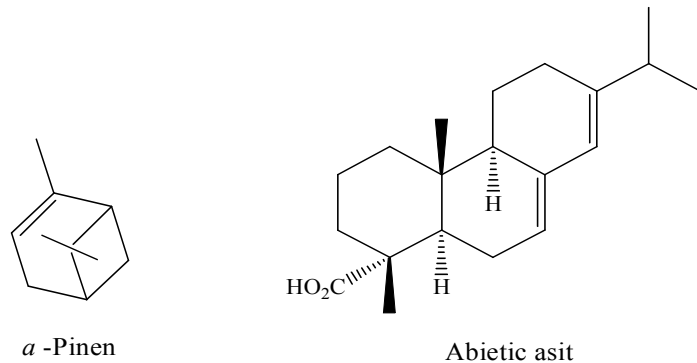
**2. 6. 2. 1. 4. Flavonoidler:** Flavonoidlerin 4.000'nin üzerinde teşhis edilmiş türü vardır.<sup>73</sup> İki aromatik halkanın oksijen ile halkalaşan üç karbon atomu ile bağlandığı bir  $C_6-C_3-C_6$  flavon iskeleti ile oluşan polifenolik bileşiklerin bir özel sınıfını teşkil ederler. Flavonoidlerin bazı sınıfları doymamışlık derecesi ve üç karbonlu kısmın oksidasyonu yönünden farklılık göstermektedirler. Bu yapılar flavonoid aglikonlarına tekabül ediyorlarken daha kompleks flavonoid glikozidleri belirli pozisyonlar üzerinden (flavon ve izoflavonlarda 7-hidroksil gibi) kararsız bir asidik hemiasetal bağıyla şekerlere (glukoz, rutinose, neohesperidose, vb) bağlanmak için bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahiptir.<sup>64</sup>

**2. 6. 2. 1. 5. Alkoloidler:** Bir **bitki** tarafından doğal olarak üretilen **amin** yapısında kimyasal **bileşiklerdir** (Şekil 2.6). Ayrıca **hayvanlar** ve **mantarlar** tarafından üretilen **aminlere** de alkaloidler denir. Genel olarak bağımlılık yapıcı özellikleri ile bilinirler.<sup>74</sup>



**Şekil 2.6:** Alkoloid Molekülü

**2. 6. 2. 1. 6. Terpenler:** Doğal bileşiklerin en geniş grubudur. Terpenoid veya izoprenoidler olarak bilinirler. Yaklaşık 25.000 tane terpen yapısı rapor edilmekle birlikte,<sup>75,76</sup> bunların bir kısmı yapısal açıdan araştırılmıştır. Doğal koşullarda terpenleri teşhis etmek zordur, bunların özelliklerini araştırmak için modern genetik ve moleküler metodlar geliştirilmektedir.<sup>75</sup> Şekil 2.7’de monoterpen ve diterpene örnek verilmiştir.



**Şekil 2.7:** Monoterpen ve Diterpen

### 2. 6. 3. Sekonder Metabolitleri Ayırma Metodları

Bitkiler primer (temel) ve sekonder metabolitlerinden dolayı bir biyosentetik laboratuvar olarak düşünülebilirler.<sup>58,59</sup> Bitkilerin tedavi edici özellikleri içerdikleri bu kimyasal bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

Kurutulup, toz haline getirilmiş bitkilerin bileşenlerini ayırma üç ana kategoride sınıflandırılabilir: **ekstraksiyon, zenginleştirme ve kromatografi.** Ekstraksiyon ve zenginleştirme genelde numune hazırlama basamaklarıdır, kromatografik metodlar ise hem kalitatif ve kantitatif analizi hem de izolasyonu kapsar.<sup>59</sup>

#### 2. 6. 3. 1. Ekstraksiyon teknikleri

Ekstraksiyon teknikleri, bitkilerden değerli doğal bileşiklerin elde edilmesi amacıyla kullanılır.<sup>77</sup>

Bitki bileşenlerini ayırmak için ilk ayırma yöntemi; kimyasal olarak bir çok bileşeni kapsayan katı-sıvı ekstraksiyonudur.<sup>59</sup> Bunun için klasik ve yeni teknikler kullanılmaktadır. Klasik teknikler çözücü seçimi ve ısı ve/veya çalkalamaya dayanmaktadır. Bu teknikler; sonikasyon, homojenizasyon, karıştırma ve sokslettir. Ekstraksiyon süresini kısaltan, organik çözücü tüketimini ve kirliliği azaltan yeni teknikler ilgi çekmektedir. Bunlar; süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MWE), hızlandırılmış çözücü (basınçlı akışkan) ekstraksiyonu (ASE)'dur.<sup>77-82</sup>

Sekonder metabolitlerin en basit ekstraksiyonu; hekzan, diklorometan ve etanol ile yapılandır. Bu yöntem numuneyi artan polariteye göre çözme tekniğine dayanır ve artan polariteye bağlı olarak farklı ekstraktlar elde edilir. Ekstraktlar daha

sonra silika jel tabakalarında üç çözücünün artan polaritelerine göre ayrılır. Aktif bileşenler belirlenir ve UV ışığında gözlenir. Bu ince tabaka kromatografi tekniği (TLC) etkili, çabuk ve ucuz olmakla birlikte hassas ve sadedir.<sup>71</sup>

**Klasik Soxhlet Ekstraksiyonu:** Uzun zamandan beri kullanılan soxhlet standart ve tanınmış bir tekniktir. Diğer katı-sıvı ekstraksiyon (veya süzme) metodlarının performansını ölçmede referans tekniktir. Soxhlet, bir katının sıcak çözücü ile ekstraksiyonunda kullanılır. Isıya dayanıksız bileşiklerin ekstraksiyonu dışında diğer klasik ekstraksiyon tekniklerinden üstündür.<sup>83</sup>

**Sonikasyon Destekli Ekstraksiyon:** Frekansı 20 kHz'den yüksek olan ses dalgaları katı, sıvı ve gazlarda mekanik titreşimlere sebep olurlar. Ses dalgaları, ilerledikleri yol boyunca içinden geçtikleri maddede genleşme ve sıkışma sürekliliklerine neden olurlar. Sıvı ortamdaki genleşme negatif basınç oluşturur. Bu basınç sonucu güçlü çarpışmalar oluşur.<sup>84</sup>

**Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon:** Mikrodalgalar 0.3-300 GHz frekansa sahip olan elektromanyetik ışımalarıdır. Dalgalar halinde yayılırlar, biyolojik materyallerdeki su gibi polar moleküllerle etkileşerek ısı üretirler ve tüm materyali ısıtabilirler.

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, çözücü ve katı bitki matriksine enerji iletilir, bu enerji çözücü ve katı matriksini homojen şekilde ısıtır. Bitki matriksindeki su mikrodalga enerjisini absorblar, iç ısınmaya bağlı olarak hücreler bozulmaya başlar, bu da kimyasalların matriksten desorbsiyonunu kolaylaştırır, nötrasetikler bu

şekilde elde edilir.<sup>85</sup> Mikrodalga enerjisinin etkisi ağırlıklı olarak çözücü ve katı bitki matriksinin dielektrik sabitine bağlıdır.<sup>77</sup>

**Süperkritik akışkan ekstraksiyonu:** Bir maddenin sıcaklığı ve basıncı kritik değerinin üstüne çıktığında madde süperkritik hale ulaşır. Süperkritik sıvı, hem gazların hem de sıvıların özelliklerine sahiptir. Süperkritik sıvı diğer sıvı çözücülerle karşılaştırıldığında önemli avantajları vardır. Bunun çözme gücü yoğunluğuna bağlıdır.<sup>77</sup> Yoğunluk da basınç ve/veya sıcaklık değiştirilerek ayarlanabilir. Süperkritik sıvı, sıvı çözücünden daha yüksek dağılma katsayısı ile daha düşük viskoziteye ve yüzey gerilimine sahiptir.<sup>83</sup> Bu da madde transferinde daha fazla avantaj sağlar.<sup>77</sup>

**Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu:** Toz haline getirilmiş materyalden sekonder metabolitlerin verimli ekstraksiyonu hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ile yapılabilir.<sup>62</sup> Burada yükseltilmiş sıcaklık (50-200 °C) ve basınçta (10-15 MPa) geliştirilmiş çözünürlük kinetikleri kullanılır.<sup>77</sup> ASE ile ekstraksiyon çözücü tüketimini % 95 azaltır, süre kısadır (14 dakika) ve otomatiktir. ASE aynı zamanda yüksek-hız ekstraksiyonu (basınçlı çözücü ekstraksiyonu) olarak bilinir. Kantitatif yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) analizi onu takip eder. Bu yöntem 100'den fazla şifalı bitkinin parmak izini almakta kullanılmıştır.<sup>62</sup>

### 2. 6. 3. 2. Zenginleştirme

Zenginleştirme sürecinde ekstraksiyon veya elde edilen sonuçların tekrarlandığı teknikler kullanılmaktadır. Burada sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile çözücü

ayrılması çok sık uygulanan methodtur, ilgili olmayan bileşenler büyük oranda uzaklaştırılabilir. Özellikle bir biyoanaliz ile beraber kullanıldığında fraksiyonlar aranan bileşen açısından zenginleştirilir, bir bileşen çabukça elde edilebilir.<sup>59,86</sup>

**2. 6. 3. 2. 1. Kolon Kromatografisi:** Kolon kromatografisi, adsorpsiyon kökenli bir katı-sıvı kromatografi tekniğidir. Bu teknikte "kolon" adı verilen ucu musluklu cam borular kullanılır.

Kolon kromatografisinde sabit faz olarak çeşitli maddeler kullanılır. Bu maddeler; silikajel, alümina, kömür, florisil (magnezia-silika karışımı), kalsiyum karbonat ve kalsiyum oksit, magnezyum karbonat ve magnezyum oksit, kizelgurlar (fullerler), poliamidler, nişasta, toz şeker, talk sayılabilir. Bunlardan asidik olanlara silika, bazik olanlara alumina, nötral olanlara da kömür örnek verilebilir.

Kromatografide hareketli sıvı faz olarak kullanılan çözücülerini şöyle sınıflandırabiliriz; (i) polaritesi çok düşük olanlar (sikloheksan, petrol eteri, benzen, toluen, karbon tetra klorür), (ii) orta polariteye sahip olanlar (kloroform, metilen klorür, etil asetat, dietil eter, n-butanol, izopropanol), (iii) yüksek polariteye sahip olanlar (metanol, etanol, aseton), ayrıca su dahil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çeşitli oranlardaki karışımları kullanılabilir.

Kolon üzerine kurulan kromatografilerde hareketli faz, kolondaki sabit faz içinden geçerek kolonun altına iner. Ayrılacak maddenin hareketli faz ve sabit fazla etkileşmesi sırasında kolondaki hızı maddenin polaritesine bağlı olarak değişir. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan madde kolon içinde en hızlı yol alırken (kolonda en az kalırken), sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan madde en yavaş yol alır. Kolonun tepesinden aynı anda bırakılan (enjekte edilen) maddeler

kolonun altına farklı zamanlarda ulaşırlar. Bu sırada her maddenin tanecikleri kendi aralarında kümeler meydana getirerek kolondan aşağıya doğru bantlar halinde yol alırlar.<sup>87</sup>

**2. 6. 3. 2. 2. Hareketli Faz Çözücü Seçimi:** Hareketli faz çözücü seçiminde, çözücüleri benzer özellikleriyle gruplara ayırma süreçlerinde çözücülerin iki özelliği dikkate alınır. Çözücülerin çözücü güçlerinin ve seçiciliklerinin deneysel olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Çözücü gücü, kromatografide yer değiştirmeye neden olan bir parametredir. Bu, çözücünün tek başına bir özelliği olarak düşünülemez, çözücü ve durağan fazın birleşik özelliğidir. Örneğin; durağan faz silika jel olduğunda su güçlü bir çözücü iken, durağan faz kimyasal bağlı silika jel tabakası olduğunda su zayıf bir çözücüdür.

Çözücü seçiciliği; bir ayırma işlemi için uygun çözücü gücüne sahip ayrı çözücüleri ayırdetmek için bir faktör gibi görünmektedir. Aslında ayrılmalar, çözünenle birlikte hareketli ve durağan fazlar arasındaki moleküllerarası etkileşimlerin iki fazdaki farklılıklarından meydana gelen rekabetten meydana gelir. Çözücüleri bağlı seçiciliklerinin değerlerine göre sınıflandırabiliriz, fakat ayırma işlemlerinde durağan fazın özellikleri dikkate alınmalıdır. Seçicilik değerleri çözücü seçimi için başlangıçta gerekli olmasına rağmen, kromatografik ayırmalar ve çözücü seçiciliği arasındaki kalitatif bağlantı kadar anlam ifade etmez. Kromatografik ayırmaları biçimlendirmeye çalışan metodlar aynı zamanda hareketli ve durağan faz özelliklerini dikkate almalıdırlar.

Çözücüleri seçiciliklerine bağlı olarak derecelendirmek için dört metod geliştirilmiştir. Snyder'n çözücü seçiciliğinde üçgen yaklaşımı en yaygın olarak



kullanılan metottur, fakat bazı durumlarda yeterli değildir. Buradaki sınıflandırma çözücülerin üç örnek çözünenle olan etkileşimlerine dayanmaktadır. Bu etkileşimler, çözücülerin gaz-sıvı dağılma katsayılarının bu örnek çözücülerin molekül kütlesi ve dağılma etkileşimlerindeki farklılıklarla belirlenir. Üç tane polar dağılma sabitinin toplamı çözücü gücünün miktarını ( $P'$ ) verir ve her bir polar dağılma sabitinin bunların toplamına oranı seçiciliğin ( $x_e, x_d, x_n$ ) değerini verir. Her bir çözücüye üç çözücü seçicilik koordinatlarına göre belirtmek ve sonuçları bir üçgenin ( $x_e + x_d + x_n = 1$ ) yüzeyinde çizmekle çözücüler sekiz grupta sınıflandırılır. Aynı gruptaki çözücülerin benzer ayırma özellikleri göstermeleri beklenir ve bunlar sadece hassas ayırma işlemlerinin ayarlanmasında kullanılmaya uygundur.

Farklı gruplardaki çözücüler farklı seçicilik karakterlerine sahiptirler ve bunlar büyük ihtimalle farklı ayrılma türlerine olanak sağlarlar. Çözücü seçiciliğinde üçgen yaklaşımında çözücü sınıflandırması ile kazanılan en büyük avantaj; metod geliştirme fikrinin farklı gruplardan tipik bir çözücü (veya sadece birkaç çözücü) kapsamı ve bütün çözücü gruplarının metod geliştirme sürecinde araştırılan aralıkta bulunmalarıdır. İnce tabaka kromatografisinde metod geliştirmek için uygun çözücülerin seçimi bu üçgendeki özelliklerine dayanmaktadır.

Çözücü seçiciliğinde üçgen yaklaşımında en önemli sakınca; basit bir çözünenin özellikleriyle bir başka moleküllerarası etkileşimin bir araya gelmesidir.<sup>22</sup>

### **2. 6. 3. 3. Kimyasal ayırma metodları (Kromatografi)**

Kromatografik çalışmaların ortak amacı; madde karışımlarını analitik veya preparatif amaçla birbirlerinden ayırmaktır. Bütün kromatografik tekniklerde hareketli ve sabit faz vardır, madde bunun içinden akar veya geçer. Numune

içerisindeki maddelerin hareketli ve sabit fazla kimyasal ve fiziksel etkileşimi sonucu ayrışmalar gerçekleşir.<sup>87</sup>

Bir ham ekstraktan biyoaktif doğal ürünü çıkarma süreci; ayırmanın en erken basamaklarında sıvı kromatografisinin (LC) de kullanıldığı biyoaktivite yöntemiyle ayırma metodlarıdır. Biyolojik analizde dikkate değer aktivite gösteren bitki ekstraktları kimyasal metodlar (LC/UV/MS) kullanılarak araştırılır. Kimyasal ayırma metodları biyoaktif bileşenlerin izolasyonunu ve yayılımını hedefler. Bu metodlar; ekstraktlarda veya ham maddenin ilk ayırma basamaklarında bilinen metabolitleri tanımlamaya olanak sağlar, bu da ekonomik açıdan önem taşır.<sup>62</sup>

**İnce tabaka kromatografisi (TLC)**, en basit ve ucuz biyoaktivite tarama metodudur, çünkü uygulanması kolaydır, tekrarlanabilir ve az malzemeye gereksinim duyulmaktadır. Ancak, metabolitlerin etkin ayrılması için, seçici ve hassas ayırmaya ek olarak bilgisayara bağlı yapısal bilgi sağlama yeteneğine sahip olan, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri tercih edilmektedir. Bu teknikler araştırmacıların çalışmalarında doğal ürünlerin hızlı karakterizasyonu ve etkili lokalizasyonu için analitik destek sağlarlar.<sup>34</sup>

**Yüksek performans sıvı kromatografisi/Ultraviyole (LC/UV)**, ham bitki ekstraktlarının analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal ürünlerin UV spektrumu LC/UV ile on-line (elektronik işlem) elde edilir. Bu spektrum bileşenlerin tipi ve belirli bileşik sınıfları hakkında bilgi verir.<sup>34</sup>

**Yüksek performans sıvı kromatografisi/Kütle spektroskopisi (LC/MS)**, en yeni tekniktir. Kütle spektrometresi en duyarlı moleküler analiz metotlarından biridir. Analitlerin hem molekül ağırlığı hakkında hem de yapısı hakkında bilgi verir. Saflaştırma ultra-yüksek verim analizi LC-MS ile yapılır, bu teknik toplanmış ve analiz edilmiş parçaları minimize eder.<sup>34</sup>

**Yüksek performans sıvı kromatografisi/Nükleer magnetik rezonans (LC/NMR)**, son zamanlara kadar duyarlı olmadığından dolayı az kullanılmaktaydı. Fakat, teknik alandaki yenilikler birçok uygulamaya olanak sağlamıştır. LC/NMR doğal ürünlerin bilgisayar programı (on-line) ile yapı belirleme özelliğine sahiptir. Çözelti ortamında organik bileşiklerle ilgili detaylı yapısal bilgi elde etmek için en güçlü spektroskopi tekniği NMR'dır.<sup>21</sup> LC/NMR cihazı basittir ve metanol veya asetonitril kullanılmasına olanak sağlar.<sup>34</sup>

**Ters akım kromatografisi (CCC)**, metaboliti tanımlar, profilini çizer ve yapısı hakkında bilgi verir. Bu teknik; saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerinde yüksek verim sağlar.<sup>62</sup>

#### **2. 6. 4. Antimikrobiyal Karakter**

Antimikrobiyal; bakteri, mantar, virüs gibi mikroorganizmaları öldüren veya büyümelerini engelleyen maddeye denir.

Antimikrobiyaller ilk olarak Pasteur ve Joubert tarafından bir bakterinin diğer bakterinin büyümesini durduğunu gözlemlemeleri ile keşfedilmiştir. Onlar ilk etapta bir bakterinin büyümesini durduran nedenin diğer bakterinin antibiyotik

üretmesinden kaynaklandığını bilmiyorlardı. Teknolojik olarak, antibiyotikler sadece bir mikroorganizma tarafından üretilen, başka bir mikroorganizmanın büyümesini durduran veya mikroorganizmayı öldüren maddelerdir. Antibiyotik kavramı ise; bakteriyel enfeksiyonu iyileştiren herhangi bir ilaç için kullanılır. Antimikrobiyaller sadece antibiyotikleri kapsamaz, sentetik olarak oluşturulan bileşikleri de kapsarlar.<sup>88</sup>

Penisilin ve tetrasiklin gibi antimikrobiyallerin keşfi insanların daha iyi sağlık standardına kavuşmasını sağlamıştır.<sup>89</sup>

#### **2. 6. 4. 1. Bitkisel uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri**

Uçucu yağlar, bitkilerden, su veya su buharı destilasyonu ile elde edilen, normal koşullarda sıvı, bazen donabilen uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Uçucu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir. Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösteren pek çok uçucu yağın, antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir.<sup>88-90</sup>

Bitkisel uçucu yağlar bilimsel ve ticari olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarının başında kozmetik, ilaç, gıda sanayi, aromaterapi ve fitoterapi gelmektedir. Bunlar hücreler arasında bilgi taşınması, dış etkenlere karşı koruma ve dengeleyici özelliğe sahiptir. Önemli hormonlar uçucu yağların bileşenlerindedirler. Bitkisel yağlar bitkilerin çiçek, meyve, kabuk, yaprak, rizom, reçine ve odun kısımlarından elde edilir.<sup>91-92</sup>

Yapılan araştırmalar bitkilerin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin olduğunu göstermiştir. Uçucu yağlarda 2000'den fazla kimyasal bileşenin bulunduğu, en önemlilerinin ise terpenler ve fenilpropanlar olduğu tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal etki, uçucu yağ taşıyan bitkinin ekolojik şartlarına plantasyon veya doğal form olmasına bağlı olarak değişir.<sup>88</sup>

Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri genel olarak agar difüzyon, broth-dilüsyon ve disk difüzyon metotları ile tespit edilir.<sup>92</sup>

### **2. 6. 5. Bitki ve Bitkisel Ürünlerin İlaçlarla Oluşturduğu Yan Etkiler**

Bitkiler koruyucu ve tedavi amaçlı olarak tarihten günümüze kadar kullanılmaktadır. Bitkileri üretenler ve ticaretini yapanlar için bu bitkilerin güvenilirliği ve etkinliği önemli değildir. Bitkilerin yan etkileri ve ilaçlarla birlikte kullanıldıklarında meydana gelebilecek ilaç etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir. Bitkiler ve bitkisel ürünler sentetik ilaçlarla birlikte tedavi ve herhangi bir hastalığın önlenmesinde kullanıldığında potansiyel ilaç etkileşimi ve yan etkiler meydana gelebilmektedir. Antibiyotiklerle günlük olarak alınan bazı yiyeceklere ilave edilen baharatlardaki maddeler etkileşime geçerek istenmeyen yan etkilere ve etkinliğin azalmasına neden olabilmektedirler.<sup>88</sup>

## 2. 7. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Alma ve ark. (2003) Toros Karaçamı (*Pinus nigra* Arn. Subsp. *Pallasiana*, Anadolu Karaçamı), Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L., Damla Sakızı), Antepfıstığı (*Pistacia vera* L., Antepfıstığı), Köknar (*Abies cilicia*, Toros Köknarı), Toros Sediri (*Cedrus libani* L., Lübnan Sediri), Badem (*Amygdalus communis* L.) ve Sumak (*Rhus coriaria* L.) bitkilerinden elde edilen reçinelerden hidro-destilasyon metodu kullanarak farklı sürelerde (1-2-3-4 saat) uçucu yağlar elde etmişlerdir. Bu yağların verimleri, kimyasal içerikleri, antioksidant ve mikrobiyolojik aktiviteleri incelenmiş, kırılma indisleri ölçülmüştür. En yüksek ortalama uçucu yağ verimi (% 10,85) Antepfıstığı ve en düşük (% 0,84) Toros Sediri'nde gözlenmiş, Sumak ve Badem'den elde edilen reçinede uçucu yağ tespit edilmemiştir. Bu uçucu yağların ortak ana bileşeninin en yüksek verimle  $\alpha$ -pinen (% 24.80 - % 74,70) olduğu bulunmuştur.

En etkili antioksidant aktivite ve % DPPH söndürme aktivitesi *Pinus nigra* sakızının uçucu yağına ait olanda bulunmuştur. En etkili indirgeme gücü ve antimikrobiyal aktiviteye *Pistacia lentiscus* L.'un uçucu yağının sahip olduğu gözlenmiştir.<sup>93</sup>

*Pistacia terebinthus* L. subsp. *terebinthus* L. meyvelerinden elde edilen aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidant aktivitesi Topçu ve ark. (2007) tarafından çalışılmıştır. Bu araştırmada ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavonoid bileşen miktarları,  $\beta$ -karoten ağartma potansiyeli, DPPH radikalini söndürme aktivitesi, süperoksit anyon radikalini söndürme aktivitesi, indirgeme gücü ve metal şelatlama aktivitesi incelenmiştir. TLC tabakalarında kontrol edilince her iki

ekstraktın da oldukça benzer kimyasal yapı gösterdiği bildirilmektedir. Süperoksit anyon radikali ve DPPH radikali üzerinde oldukça yüksek söndürme aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Ekstraktlar bu benzerliklere bağlı olarak birleştirilip silika jel kolonunda fraksiyonlandırılmıştır. En yüksek DPPH aktivitesi gösteren üç fraksiyon saflaştırılarak bilinen flavonoid grubu olan apigenin, luteolin, luteolin 7-O-glucoside, quercetin, quercetagenin 3-methyl ether 7-O-glucoside ve isoscutellarein 8-O-glucoside ile birlikte yeni bir flavon (6'-hydroxyhypolaetin 3'-methyl ether) elde edilmiştir. Bunların yapıları UV, UV shift reaktifleri ve <sup>1</sup>H NMR spektroskopik teknikleri kullanılarak tespit edilmiştir. Yeni flavononun (6'-hydroxyhypolaetin 3'-methyl ether) yüksek β-carotene ağartma aktivitesi gösterdiği ifade edilmektedir.<sup>94</sup>

Singh ve ark. (2007) *Acacia auriculiformis* A. Cunn. bitkisinin aseton ekstrakt/fraksiyonlarının antioksidant gücünü araştırmışlardır. Bu araştırmada, DPPH testi, deoksiriboz testi, indirgeme gücü, şelatlama gücü ve lipid peroksidasyonu gibi *in vitro* sistemler kullanılmıştır. Ağaç kabuğu toz haline getirilip artan ve azalan polariteye bağlı olarak farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş ve bu fraksiyonlar birbirinden ayrıştırılmıştır. Bütün testlerde fraksiyonların orantılı olarak ham aseton ekstraktından daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Maksimum inhibisyon aktiviteleri DPPH testi (% 72.3), deoksiriboz testi (% 91.7), indirgeme gücü (1.63), şelatlama gücü (% 83.3) ve lipid peroksidasyonu (% 70.9) olarak bildirilmektedir. Elde edilen inhibisyon aktiviteleri askorbik asit ve BHT ile karşılaştırılmıştır. Fraksiyonlar ve ham ekstrakttaki toplam fenolik bileşenler tayin edilmiştir. Bu çalışmaya göre polifenolik bileşenler açısından zengin olan fraksiyonların ham ekstrakttan daha etkili oldukları bildirilmektedir.<sup>95</sup>

*Ginkgo biloba* endofilik *Xylaria* sp. XY-28 meyvesinin antioksidant aktivitesini Liu ve ark. (2007) değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu metanol ekstraktlarının hem DPPH hem de  $\beta$ -karoten-linoleik asit model sisteminde güçlü antioksidant kapasite gösterdiği belirtilmektedir. Toplam fenolik ve flavonoid bileşenler Folin-Ciocalteu yöntemi ve flavonoid-alüminyum metodu kullanılarak belirlenmiştir. Çalışılan bu testler sonucu toplam fenolik ve flavonoid bileşeni en fazla olan metanol ekstraktı ( $54.51 \pm 1.05$  mg GAE/g kuru ağırlık ve  $86.76 \pm 0.58$  mg rutin ekivalent/g kuru ağırlık) ve en düşük olan hekzan ekstraktı ( $9.71 \pm 0.57$  mg GAE/g kuru ağırlık ve  $10.14 \pm 0.76$  mg rutin ekivalent/g kuru ağırlık) olarak tespit edilmiştir. Regresyon analizinden elde edilen korelasyon katsayısı toplam fenolik ve flavonoid bileşenler ile DPPH arasında pozitif ilişki olduğunu göstermiştir. GS/MS metodu ile metanol ekstraktından 41 tane bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Bunların ana bileşenlerinin esterler, fenolikler, alkanlar, karboksilatlar ve alkoller olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler sonucunda *Xylaria* sp. YX-28 meyvelerinin doğal antioksidant aktiviteye sahip olduğuna karar verilmiştir.<sup>96</sup>

*Pueraria tuberosa* Linn. (PT), *Leguminosae*, çok yıllık bir sarmaşıktır, Hindistan'da tropikal bölgelerin genelinde yetişmektedir. Ayurveda tıbbında ağrı, enflamasyon ve diğer benzer hastalıkların tedavisinde tercihen kullanılmaktadır. Bu bitkinin antioksidant gücü ilk defa Pandey ve ark. (2007) tarafından araştırılmıştır. Toplam antioksidant kapasite, lipid peroksidasyonu, süperoksit radikalini süpürme aktivitesi, hidroksil radikalini tutma potansiyeli ve metal şelatlama aktivitesine bakılmıştır. Hekzan ve metanol fraksiyonlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve demir şelatlama aktivitesi gösterdiği bildirilmektedir.<sup>97</sup>



Kumaran ve Karunakaran (2007) *Phyllanthus* cinsinden beş bitkinin metanol ekstraktlarının antioksidant aktivitelerine bakmışlardır. Toplam antioksidant aktivite, serbest radikal temizleme aktivitesi, süperoksit anyon radikal temizleme aktivitesi, hidrojen peroksit temizleme aktivitesi, nitrik oksit temizleme aktivitesi, indirgeme gücü ve metal şelatlama aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Bu bitkilerin antioksidant aktivitelerini BHT ve askorbik asit ile karşılaştırmışlardır. Bütün ekstraktların test edilen bütün metodlarda güçlü antioksidant aktivite gösterdiği bildirilmektedir (*Phyllanthus debilis* > *Phyllanthus urinaria* > *Phyllanthus virgatus* > *Phyllanthus maderaspatensis* > *Phyllanthus amarus*). Ayrıca bu bitkilerin toplam fenolik, flavonoid ve flavonol bileşenleri de ölçülmüştür. Toplam fenolik içerik ve antioksidant aktivite arasında bir oran olduğu ifade edilmektedir.<sup>66</sup>

*Salvia cedronelle* Boiss bitkisinin toprak üstündeki kısımlarının aseton ekstraktının toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid bileşen miktarını ilk defa Yeşilyurt ve ark. (2008) araştırmışlardır. Antioksidant potansiyel *in vitro*'da üç farklı test kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunlar; toplam antioksidant aktivite için  $\beta$ -karoten-linoleik asit test sistemi, radikal söndürme aktivitesi için DPPH, metal şelatlama için  $Fe^{+2}$ -ferrozine test sistemleridir. Yüksek derecede toplam fenolik bileşen içeriği, güçlü radikal söndürme gücü ve demir şelatlama etkisi gözlenmiştir. Bununla birlikte,  $\beta$ -karoten-linoleik asit test sisteminde lipid peroksidasyonunun gözlenemediği bildirilmektedir. Fitokimyasal analizler sonucu *p*-hydroxyphenylethyl docosanoate, oleanolik asit ve betulinik asitle birlikte yeni bir kumarin (3-methoxy-4-hydroxy-methyl coumarine) elde edilmiştir.<sup>98</sup>

*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. Tayvan'da yetişen bir ağaç türüdür. *C. osmophloeum* sürgünlerinin etanol ekstraktlarını antioksidant aktivite ve fitokimyasal karakter açısından ilk defa Chua ve ark. (2008) çalışmışlardır. Sıvı-sıvı ayırma teknikleri kullanılarak n-Hekzan (Hex), etil asetat (EtOAc), n-butanol (BuOH) ve su fraksiyonları elde edilmiştir. *C. osmophloeum* sürgünlerinden elde edilen ekstraktların antioksidant aktivitesini test etmek için toplam fenolik bileşen, DPPH, NBT (süperoksit radikal süpürme aktivitesi), indirgeme gücü, lipid peroksidasyonu, metal şelatlama aktivitesi ve fotokemilüminesans (PCL) tekniklerini kullanmışlar. BuOH fraksiyonunun en iyi performansı DPPH deneyi, NBT deneyi, indirgeme gücü deneyi, lipid peroksidasyonu deneylerinde gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca bu fraksiyonun en yüksek fenolik bileşene (496.7 mg GAE/g) sahip olduğu belirtilmiştir. Kaempferol-7-O-rhamnoside bu fraksiyondan izole edilmiş ve bunun aktivitesinin de sonucu desteklediği bildirilmiştir. Bu veriler sonucu *C. osmophloeum* sürgünlerinin etanolik ekstraktlarının antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve doğal sağlık ürünleri için iyi bir kaynak olduğunu tespit etmişlerdir.<sup>99</sup>

Sedir Ağacı (*Cedrus libani*), Peygamber Çiçeği (*Centaurea solstitialis* ssp. *Solstitialis*), Laden (*Cistus laurifolius*), Binbirdelik Otu (*Hypericum scabrum*), Sinirli Ot (*Plantago major*), Mürver Otu (*Sanbucus ebulus*) ve Katırtırnağı (*Spartium junceum*) bitkilerinin çeşitli kısımları Türkiye'de geleneksel ilaç olarak ülser tedavisinde kullanılmaktadır. Yeşilada ve ark. (1993) bu bitkilerin çeşitli ekstraktlarını ülser oluşturulmuş fareler üzerinde denemişlerdir. Bu çalışmalarında yaptıkları farmakolojik deneyler şunu göstermiştir; tüm bitkilerin su ekstraktları farelere oral yoldan verildiğinde önemli antiülserojenik aktivite göstermektedir.<sup>100</sup>

Başer ve ark. (1995) Antalya ve İçel (Tarsus)'den toplanan Toros Sediri'nin (*Cedrus libani* A. Rich) odun ve köklerinden su ve buhar destilasyonu ile elde ettikleri esansiyel yağları GC ve GC/MS ile analiz etmişlerdir. % 90-% 93'nü yağların oluşturduğu 37 tane bileşen karakterize etmişlerdir. Bunların da % 58.6'nı himachalene ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -)'den meydana geldiğini saptamışlardır. Daha küçük sesquiterpen izole etmek için yağlara fraksiyonel distilasyon ve kromatografik teknikler uygulanmış ve izole edilen bileşenleri spektral analizlerle (IR, MS,  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR) belirlemişlerdir. İlk ola-rak cis- ve trans-10,11 dihidroatlanton, cis- ve trans- $\beta$ -atlanton, 8, 9, dehidro-isolongifolene, longipinen,  $\alpha$ -ylangene, camphor, sativene,  $\alpha$ -guijunene, longifolene (junipene),  $\beta$ -cedrene,  $\alpha$ -calacorene, oxidohimachalene, isohimachalene, nerolidol, longiborneol, cadalene, limonene ve terpinolene *Cedrus libani*'nin bileşenleri olarak tanımlanmıştır.<sup>101</sup>

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. İçlim ve ark. (1998) Kahramanmaraş ve Hatay yöresinden toplanan Liken (*Parmelia furfuracea* (L.) Zopf.), Çiğdem (*Crocus chrysanthus* Herbert), Kuzukulağı (*Rumex scutatus* L.), Mersin (*Myrtus communis* L. subsp. *communis* le: Sibth. & Sm.), Çiriş (*Asphodelus aestivus* L.) ve Karanfil (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır.

Elde ettikleri ekstraların antimikrobiyal etkisini Disk Difüzyon metoduna göre *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus brevis* FMC 3, *Escherichia coli* DM, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* COWAN 1,

*Listeria monocytogenes* SCOTT A, bakterileri ve *Candida albicans* CCM 314, *Saccharomyces cerevisiae* WET 136 mayaları üzerinde denemişlerdir.

Çalışmada kullanılan Liken, Mersin ve Karanfil bitki ekstraları test edilen mikroorganizmaların gelişmelerini değişik oranlarda engellemiştir (9-38 mm inhibisyon zonu). Diğer bitki ekstralarının antimikrobiyal etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir.<sup>102</sup>

Yeşilada ve ark. (1999) Türkiye’de yetişen ve halk arasında peptik ülser tedavisinde kullanılan yedi bitkiden elde edilen ekstrakt ve fraksiyonların anti-*Helicobacter pylori* etkisini agar dülisyon metodunu kullanarak bir standart suşa ve *H. pylori*’nin yedi klinik izolatına karşı çalışmışlardır. Bu çalışmada *Cistus laurifolius* ve *Spartium junceum* çiçekleri, *Cedrus libani* kozalakları, *Centaurea solstitialis ssp. solstitialis* sürgün ve çiçekleri, *Momordica charantina* meyveleri, *Sambucus ebulus* sürgünleri ve *Hypericum perforatum* çiçekli sürgünleri değerlendirilmiştir. Bu bitkilerden elde edilen altı ekstraktın mikroorganizmalara karşı 1.95 ve 250 µg/mL MICs değerleri arasında aktivite gösterdiğini, *Spartium junceum* türlerinin aktivite göstermediğini belirtmektedirler. Aktif bitkiler arasında *Cistus laurifolius* inhibitör özellikleri dikkate değer bulunmuştur.<sup>103</sup>

Dığrak ve ark. (1999) Türkiye’nin Kahramanmaraş Bölgesi’nde yetişen *Pinus brutia* Ten., *Juniperus oxycedrus* L., *Abies cilicia* Ant. & Kotschy Carr., *Cedrus libani* A. Rich. ve *Pinus nigra* Arn ağaçlarının yaprak, reçine, kabuk, kozalak ve meyvelerinin kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus*

*cereus* FMC 19, *Escherichia coli* DM, *Klebsiella pneumoniae* FMC 3, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Mycobacterium smegmatis* RUT, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Listeria monocytogenes* Scoot A, *Pseudomonas euroginosa* DSM 5007, *Candida albicans* CCM 314, *Candida tropicalis* MDC 86 ve *Penicillium italicum* K.'ya karşı disk difüzyon metodu ile araştırmışlardır.

Test edilen bütün ekstraktlarda antifungal aktivite gözlenemediği, *E.coli* için sadece *A. cilicia*'nın yapraklarından hazırlanan kloform ve aseton ekstraktlarının sırasıyla 16 mm-18 mm zon çapı gösterdiğini ifade etmektedirler. Bu çalışmada kullanılan bütün bitki ekstraktlarının çalışılan diğer bakterilerin büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Sonuçlar bir ampisillin standardı ile karşılaştırıldığında, test edilen mikroorganizmaların ekstraktlara karşı genel olarak hassas, orta veya dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *Juniperus* meyvelerinin aseton ve metanol ekstraktları çalışılan mikroorganizmalara karşı dirençli bulunmuştur.<sup>104</sup>

Bazı tıbbi bitkilerden ve bu bitkilerden başlatılan hücre kültürlerinden elde edilen özütlerin antiviral ve sitotoksik özelliklerini Atalay Sökmen (2001) incelemiştir. Test edilen özütlerin hiçbirinin Herpes Simplex Virüslerine (tip I ve tip II) karşı kayda değer bir aktivite göstermediği, ancak *Hypericum capitatum* hücre kültürlerinden elde edilen bir özütün HIV-I'e karşı zayıf antiretroviral aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Diğer taraftan, *Artemia salina* LEACH (Crustacea) (Brine shrimp) ile yapılan sitotoksik aktivite test sonuçlarına göre, *Ecbalium elaterium* hücre kültürlerinden elde edilen özütte LD<sub>50</sub> 34.9 µg/mL'lik bir aktivite saptanmıştır.<sup>105</sup>

Kızıll ve ark. (2002) Sedir (*Cedrus libani*) ve Köknar (*Abies cilicia*)'ın kök ve gövdelerinden elde edilen reçinelerin etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon metodu kullanılarak test etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, iki bitkinin reçinesinin ham ekstraktlarının mikroorganizmaların büyümesini engellemede yüksek etkiye sahip olduğunu göstermiştir.<sup>106</sup>

Loizzo ve ark. (2007) Toros Sediri (*Cedrus libani*)'nin odun, yaprak ve kozalaklarından elde edilen esansiyel yağların fitokimyasal bileşimlerini ve  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktivitesini araştırmışlardır. *Cedrus libani* odununun yağı 0.14 mg/mL'lik IC<sub>50</sub> değeri gösterirken yaprak ve kozalakların yağı önemli aktivite göstermemiştir.<sup>107</sup>

Loizzo ve ark. (2008) *Cedrus libani* odununun esansiyel yağı ile kozalak ve yapraklarının etanol ekstraktlarının fitokimyasal bileşimini GS-MS ile analiz etmişlerdir. Odun esansiyel yağının ana bileşenleri himachalol (% 22.50),  $\beta$ -himachalene (% 21.90) ve  $\alpha$ -himachalene (% 10.50) bulunmuştur. Yaprakların etanol ekstraktında yüksek oranda germacrene D (% 29.40) ile karakterize edilmiştir. Kozalakların etanol ekstraktında ise başlıca  $\alpha$ -pinene (% 51.0) ve  $\beta$ -myrcene (% 13.0) karakterize edilmiştir. Ekstrakt ve esansiyel yağları araştırmakla birlikte bunların *Herpes Simpleks Virus* TipI'e (HSV-1) karşı *in vitro* antiviral aktiviteleri için de bileşikleri teşhis edilmiştir. Sitotoksisite Vero hücrelerinde MTT testi ile değerlendirilmiştir. Kozalak ve yaprakların etanol ekstraktları sitotoksik olmayan konsantrasyonda 0.50 ve 0.66 mg/mL IC<sub>50</sub> değeri göstermiştir. Esansiyel yağın IC<sub>50</sub> değerini 0.44 mg/mL olarak saptamışlardır.<sup>108</sup>

## 2. 8. KAYNAKLAR

1. Gökpinar, Ş.; Koray,T.; Akçiçek, E.; Gökşan, T.; Durmaz, Y. E. *Ü. Su Ürünleri Dergisi*, **2006**, *23*, 85-89.
2. Pham-Huy, L.A.; He, H.; Pham-Huy, C. *International Journal of Biomedical Science*, **2008**, *4*, 89-96.
3. Fessenden, R.J.; Fessenden, J.S.; Logue, M.W., 2001. *Organik Kimya*, Uyar, T., Güneş Kitabevi, Ankara, 2001.
4. Waris, G., Ahsan, H. *Journal of Carcinogenesis*, **2006**, *5*, 14.
5. Halliwell, B. *Mutat Res.*, **1999**, *443*, 37-52.
6. Halliwell, B. *Biochemistry Society Symposium*, **1995**, *61*, 73–101.
7. Yıldırım, A.; Mavi, A.; Oktay, M.; Kara, A.A.; Algur, Ö.F.; Bilaloğlu, V. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, *48*, 5030–5034.
8. Gülçin, İ.; Oktay, M.; Küfrevioğlu, Ö.İ.; Aslan, A. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, *79*, 325–329.
9. Squadriato, G.L.; Peyor, W.A. *Free Radical Biology and Medicine*, **1998**, *25*, 392–403.
10. Buechter, D.D. *Pharm Res.*, **1988**, *5*, 253-60.
11. Akkuş, İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
12. Aşıcıoğlu Y.T. *Sıçanlardaki Kronik Alkolik Karaciğer Hasarına Likopenin Etkisi, Uzmanlık Tezi*, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya ve klinik Biyokimya Bölümü, İstanbul, 64s, 2005.
13. Southorn, P.A.; Powis, G. *Mayo Clin Proc.*, **1988**, *63*,381-389. Review.
14. Cochrane C.G., 1991. *Am J Med.*, **1991**, *91(3C)*, 23-30.

15. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. *Free radical in biology and medicine*, Clarendon Press, Oxford, pp. 23–30, 1989.
16. Halliwell, B. *Lancet*, **1994**, *67*, 85–91.
17. Davies, K.J. A. *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*, *Biochemistry Society Symposium*, 1994, *61*, 1–34.
18. Robinson, F.E.; Maxwell, S.R.J.; Thorpe, G.H.G. *Free Radical Research*, **1997**, *26*, 291–302.
19. Büyükokuroğlu, M.E.; Gülçin, İ., Oktay, M.; Küfrevioğlu, Ö.İ. *Pharmacological Research*, **2001**, *44*, 491–495.
20. Gülçin, İ.; Büyükokuroğlu, M.E.; Oktay, M.; Küfrevioğlu, Ö.İ. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, *86(1)*, 51-58.
21. Albert, K.J. *Chromatogr. A*, **1995**, *703*, 123-147.
22. Poole, C.F.; Dias, N.C. *Journal of ,chromatography, A*, **2000**, *892*, 123-142.
23. Dawn, B.M.; Allan, D.M.; Colleen, M.S. *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*, Lippicott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, **1996**.
24. Ahsan, H.; Ali, A.; Ali, R. *Clin Exp Immunol.*, **2003**, *31*, 398-404.
- 25 Knight, J.A. *Ann Clin Lab Sci.*, **1995**, *25*, 111-21.
26. Kehrer, J.P. *CRC Critical Review Toxicology*, **1993**, *23*, 21–48.
27. Glavind, J.; Hartmann, S.; Clemmesen, J.; Jessen, K.E.; Dam, H. *Acta Pathol Microbiol Scand.*, **1952**, *30*, 1–6.
28. Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jürgens, G. *Free Radic Biol Med.*, **1992**, *13*, 341–90.
29. Esterbauer, H.; Wag, G.; Puhl, H. *Brit Med Bull.*, **1993**, *49*, 566–76.



30. Laguerre, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. *Progress in Lipid Research*, **2007**, *46*, 244-282.
31. Cillard, J.; Cillard, P. *Ol Corps Gras Lipides*, **2006**, *13*, 24–9.
32. Gordon, M.H. *The mechanism of antioxidant action in vitro*, In: Hudson B.J.F., editor, *Food antioxidants*, Amsterdam: Elsevier, London/New York, pp 1–18. 1990.
33. Barclay, L.R.C.; Ingold, K. U. *J Am Chem Soc.*, **1981**, *103*, 6478–85.
34. Hostettmann, K. *Strategy for the Biological and Chemical Evaluation of Plant Extracts*, **1999**, IUPAC.
35. Young, I.S.; Eneny, J.M. *Biochemical Society Transactions*, **2001**, *29*, 358-362.
36. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. *Methods Enzymol.*, **1990**, *186*, 1–85.
37. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **1993**, *90*, 7915-7922.
38. Di Mascio, P.; Devasagayam, T.P.; Kaiser, S.; Sies, H. *Biochem Soc Trans.*, **1990**, *18*, 1054–6.
39. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. *Free Radic Biol Med.*, **1997**, *22*, 749–60.
40. Seifried, H.E.; Anderson, D.E.; Fisher, E.I.; Milner, J.A. **2007**, *18*, 567-579.
41. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. *Cell*, **2000**, *100*, 57–70.
42. Ohshima, H.; Tatemichi, M.; Sawa, T. *Arch Biochem Biophys*, **2003**, *417*, 3–11.
43. Szatrowski, T.P.; Nathan, C.F. *Cancer Res*, **1991**, *51*, 794–8.
44. Oberley, T.D.; Oberley, L.W. *Histol Histopathol*, **1997**, *12*, 525–35.

45. Seifried, H.E.; Anderson, D.E.; Sorkin, B.C.; Costello, R.B. *Executive summary report, J Nutr.*, **2004**, *134*, 3143S–63S.
46. Itabe, H. *Biol Pharm Bull.*, **2003**, *26*, 1–9.
47. Frostegard, J.; Wu, R.; Lemne, C.; Thulin, T.; Witztum, J.L.; de Faire, U. *Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension, Clin Sci (Lond)*, **2003**, *105*, 615–20.
48. Alexander, R.W. *Hypertension*, **1995**, *25*, 155–61.
49. Cai, H.; Harrison, D.G. *Circ Res.*, **2000**, *87*, 840–4.
50. Johnson, T.M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Lowenstein R.A.; Finkel, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, *93*, 11848–52.
51. Harman, D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry, Univ. Calif. Rad. Lab. Report No: 3078, 1995.
52. Keha, E.E.; Küfrevioğlu, Ö.İ. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, Ankara, 3. baskı, 2004.
53. Bramley, P.M. *Phytochemistry*, **2000**, *54*, 233-6, Review.
54. Khachik, F.; Carvalho, L.; Bernstein, P.S.; Muir, G.J.; Zhao, D.Y.; Katz, N. B. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2002**, *227*, 845-51, Review.
55. Dorgan, J.F.; Sowell, A.; Swanson, C.A.; Potischman, N.; Miller, R.; Schussler, N.; Stephenson, H.E. *Cancer Lett.*, **2000**, *154(2)*, 201-10.
56. Cadenas, E.; Packer, L. *Handbook of antioxidants*. Marcel Dekker. Inc. New York, 1996.
57. Harborne, J.B.; Baxter, H.; Moss, G.P. *Phytochemical Dictionary—A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis, London, 1999.

58. Haensel, R.; Sticher, O.; Steinegger, E. *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, Springer, Berlin, 1999.
59. Nyiredy, Sz. *Journal of Chromatography B*, **2004**, *812*, 35-51.
60. Nyiredy, Sz., 2002. *Gyogynövénykutatás: a gyógyszerkutatás természetes része Magyar Tudomány*, *12*, 1600.
61. Mueller, H. in: Luijendijk, T.; de Graf, P.; Remmelzwaal, A.; Verpoorte, R. *Eds. 2000 Years of Natural Products Research: Past, Present and Future*, University of Leiden, Leiden, p. 5, 1999.
62. Wink, M. *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*, CRP Pres., 1999.
63. Stecher, G.; Huck, C.W.; Stöggel, W.M.; Bonn, G.K. *Trends Anal. Chem.*, **2003**, *22*, 1-14.
64. Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D. *Molecules*, **2007**, *12*, 1496-1547.
65. Bennick, A. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **2002**, *13*, 184-196.
66. Kumaran, A.; Karunakaran, R.J. *LWT*, **2007**, *40*, 344-352.
67. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. *Food Chem.*, **2006**, *99*, 191-203.
68. Harborne, J.B.; Simmonds, N.W. *The natural distribution of the phenolic aglycones*. In: *Biochemistry of phenolic compounds*; Academic Press: New York, pp. 77-127, 1964.
69. Krinsky, N.I. *Ann NY Acad Sci.*, **1998**, *854*, 443-7.
70. Mehansho, H.; Butler, L.G.; Carlson, D.M. *Ann. Rev. Nut.*, **1987**, *7*, 423-440.

71. Khanbabae, K.; Van Ree, T. *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 641-649.
72. Porter, L.J. *Tannins*. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. I, Plant Phenolics; Dey, P.M., Harborne, J.B., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, pp. 389-419, 1989.
73. Middleton, Jr., E.; Kandaswami, C. *The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer*. In: *The Flavonoids. Advances since 1986*. Harborne J. B., Ed.; London: Chapman and Hall, pp. 619-645, 1994.
74. UIPAC. Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure, on page 1313, 1995.
75. Gershenzon, J.; Dudavera, N. *Nature Chemical Biology*, **2007**, *3*, 408-414.
76. Buckingham, J. *Dictionary of Natural Products*, Chapman and Hall, London, 1994.
77. Wang, L.; Weller, C. L. *Trends in Food Science & Technology*, **2006**, *17*; 300-312.
78. Marr, R.; Gamse, T. *Chemical Engineering and Processing*, **2000**, *39*, 19-28.
79. Lang, Q.; Wai, C.M. *Talanta*, **2001**, *53*, 771-782.
80. Meireles, A.; Angela, M. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **2003**, *7*, 321-330.
81. Kaufmann, B.; Christen, P. *Phytochemical Analysis*, **2002**, *13*, 105-113.
82. Smith, R.M. *Journal of Chromatography A*, **2002**, *975*, 31-46.

- 83.** Luque de Castro, M.D.; Garcia-Ayuso, L.E. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, *369*, 1–10.
- 84.** Luque-Garcia, J.L.; Luque de Castro, M.D. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, *22*, 41–47.
- 85.** Kaufmann, B.; Christen, P.; Veuthey, J.L. *Phytochemical Analysis*, **2001**, *12*, 327–331.
- 86.** Hostettmann, K.; Marston, A. *Preparative Chromatography Techniques*, Springer, Berlin, 1998.
- 87.** Gündüz, T. *Instrumental Analiz*, Gazi Kitabevi, 2002.
- 88.** Toroğlu, S.; Çenet, M. *Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar*, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, *9*(2), 2006.
- 89.** Tanker, M.; Tanker, N. *Farmakognozi*. Cilt.2. Ankara Üniv. Eczacılık Fakültesi Yayınları, Yayın No:65, Ankara, 1990.
- 90.** Bağcı, E.; Dığrak, M. *Tr. J. of Biology*, **1997**, *21*, 273-281.
- 91.** Çelik, E.; Çelik, G.Y. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2007**, *2*, 1-6.
- 92.** Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. *Journal of Applied Microbiology*, **1999**, *86*, 985-990.
- 93.** Alma, M.H.; Efe, F.T. *Türkiye’de Yetişen Bazı Bitki Türlerine Ait Sakızlardan Elde Edilen Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri, Antioksidant ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, 2003.

94. Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarıkürkçü, C.; Öztürk, M.; Ulubelen, A. *Food Chemistry*, **2007**, *103*, 816-822.
95. Singh, R.; Singh, S.; Kumar, S.; Arora, S. *Food chemistry*, **2007**, *103*, 1403-1410.
96. Liu, X.; Dong, M.; Chen, X.; Jiang, M.; Lv, X.; Yan, G. *Food Chemistry*, **2007**, *105*, 548-554.
97. Pandey, N.; Chaurasia, J.K.; Tiwari, O. P.; Tripathi, Y.B. *Food Chemistry*, **2007**, *105*, 219-222.
98. Yeşilyurt, V.; Halfon, B.; Öztürk, M.; Topçu, G. *Food Chemistry*, **2008**, *108*, 31-39.
99. Chua, M-T.; Tung, Y-Y.; Chang, S-T. *Bioresource Technology*, **2008**, *99*, 1918-1925.
100. Yeşilada, E.; Sezik, E.; Fujita, T.; Tanaka, S.; Tabata, M. *Phytotherapy Research*, **1993**, *7*, 263-264.
101. Başer, K.H.C.; Demirçakmak, B. *Chemistry of Natural Compounds*, **1995**, *31*, 16-20.
102. İçlim, A.; Dığrak, M.; Bağcı, E. *Tr. J. of Biology*, **1998**, *22*, 119-125.
103. Yeşilada, E.; Gürbüz, İ.; Shibata, H. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, *66*, 289-293.
104. Dığrak, M.; İçlim, A.; Alma, M.H. *Phytotherapy Research*, **1999**, *13*, 584-587.
105. Sökmen, A. *Turk J Biol.*, **2001**, *25*, 343-350.
106. Kızıl, M.; Kızıl, G.; Yavuz, M.; Aytekin, Ç. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2002**, *38*, 144-146.

**107.** Loizzo, M.R.; Saab, A.M.; Statti, G.A.; Menichi, F. *Fitoterapia*, **2007**, *78*, 323-326.

**108.** Loizzo, M.R.; Saab, A.; Tundis, R.; Statti, G.A.; Lampronti, I.; Menichini, F.; Gambari, R.; Cinatl, J.; Doerr, H. W. *Phytomedicine*, **2008**, *15*, 79-83.

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3. 1. MATERYAL**

Bu çalışmanın materyalini oluşturan *Cedrus libani* A. Rich ( No: DUF 0052) reçinesi ve *Abies cilicia* (Ant. and Kotschy) Carr., subsp. *Isaurica* (No: DUF 0053) reçinesi Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Çetin AYTEKİN tarafından Ağustos 2000'de Antalya'da toplandı. Aynı fakültenin Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından teşhis edildi. Reçine örnekleri Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır.

#### **3. 1. 1. Reçineleri Kullanılan Ağaçların Türü, Yayılışı ve Reçinelerin**

#### **Halk Arasında Kullanım Alanları**

##### **3. 1. 1. 1. Sedir ağacı (*Cedrus Libani*)**

*Cedrus libani* Toros Sediri olarak da bilinir, çamgiller (*Pinaceae*) familyasından bir sedir türüdür. Düzgün gövdeli, gösterişli ve boylu olan sedir ağaçları 1000 yıldan fazla yaşar, kısa ve uzun sürgünleri bulunur. Kısa sürgünler her yıl uzar, bunlarda 30-40 tane yaprak bir arada demet şeklinde bulunur. Kozalaklar yumurta şeklinde olup kozalak pulları çok sıktır. Dişi kozalaklar kısa ve kalın sapa sahiptir.<sup>1</sup>

Sedir sonbahar donlarına karşı çok hassastır, sıcaklık istekleri fazladır, besini bol olan toprakları tercih eder. Odunundan çıkarılan yağından faydalanılır. Eterik yağlı ve güzel kokulu odunları çok dayanıklıdır. Odunu yumuşak olup çok eski devirlerden beri aranan bir ağaçtır. Değişik yetişme ortamlarına biyolojik uyum kabiliyeti yüksektir. Odunu yaygın olarak peyzaj çalışmalarında kullanılmaktadır, Fransa ve Yunanistan'da tür ve orijin denemeleri başlatılmıştır.<sup>1-3</sup>





**Resim 3.1:** Sedir Ağacı

Doğal olarak Güney Anadolu ve Lübnan'da yayılmıştır. Sedirin Toros Dağları'nda özellikle Antalya Körfezi'nin batısında Tahtalı ve Bey Dağları'nda çok geniş ve güzel ormanları bulunur ve büyük bir olasılıkla sedirin gen merkezi burasıdır. Ayrıca Toros Dağları'nın doğu kesiminde, Amanos Dağları'nda (Hatay ili) atlama olarak oldukça fazla yayılma gösterir. Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde çok iyi bir gelişme gösterir ve 40m boy ile 3m çapa ulaşabilir. Lübnan'da Cebellübnan'da kalmıştır. Türkiye'de bir cins bir türü bulunur: *Cedrus libani* A. Rich.–Toros veya Lübnan Sediri.<sup>1,2</sup>

**Halk arasında kullanımları:** Halk arasında **Katran Ağacı**, **Hamalak** olarak bilinir.<sup>1</sup> Akne, dermatit, egzema, nezle, bronşit, artrit, romatizma, sistit ve mantar hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Antiseptik etkisi olduğuna inanılır. Yapraklar ve kozalaklar antimikrobiyal aktivite gösterirler.<sup>4</sup> Kozalaklar aynı zamanda anti-ülserojenik aktiviteye sahiptir.<sup>5</sup> Kök ve gövdesinden elde edilen reçinenin etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve test edilen mikroorganizmaların büyümesini etkili şekilde engellediği gözlemlenmiştir.<sup>6</sup>



**Resim 3.2:** Sedir Ağacı

Odunu eski çağlardan beri bilinir; Hz. Süleyman'ın ünlü sarayının yapımında, Efes'teki Diana Tapınağı'nda, Gordion'da Kral Mezarında ve daha birçok tarihi ve kutsal binalarda Sedir odununun kullanıldığı belgelerle saptanmıştır.<sup>7</sup>

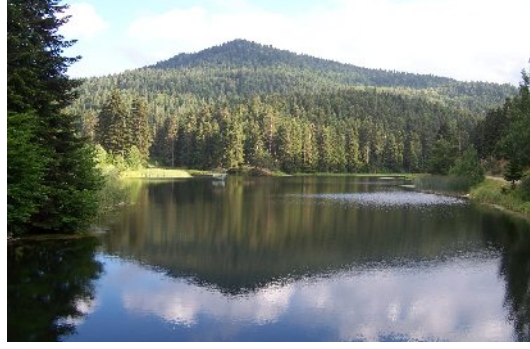
### **3. 1. 1. 2. Sarı katran (ince katran)**

Güney Anadolu dağlarında yetişen *Cedrus libani* A. Rich. (Sedir ağacı, Katran ağacı, Kamalak) türünün kök ve gövde odunundan elde edilen bir katrandır (Pix Cedria). Kırmızımtırak esmer renkli, şurup kıvamında, özel ve kuvvetli kokulu, akıcı bir sıvıdır.<sup>8</sup> Günümüzden 4000 yıl önce Mısırlılar, Sedir Ağacının kuru destilasyonu ile sedir katranı elde etmişlerdir.<sup>7</sup>

Haricen, hayvanların deri hastalıklarında ve derilerinde bulunan bazı parazitlerin (kene, bit, sinek gibi) temizlenmesinde kullanılır. Küçük miktarlarda arı kovanlarına konarak kovan güvesi ile mücadele edilir.<sup>8</sup>

### 3. 1. 1. 3. Köknar ağacı (*Abies*)

Köknar (*Abies*) çamgiller (*Pinaceae*) familyasının *Abies* cinsinden iğne yapraklı ağaç türlerine verilen addır.<sup>2</sup>



**Resim 3.3:** Köknar Ormanı

Köknarlar 20m-30m kadar boylanabilen, düzgün ve dolgun gövdeli ağaçlardır. Dallar gövdeye çevresel olarak dizilmiş sadece uzun sürgünü bulunan herdem yeşil, yaprağını dökmeyen ağaçlardır. Kozalaklar tepe kısmındaki dallarda dik olarak dallara tespit edilmiş olup silindir şeklindedir. Kozalak üzerindeki örtü pulları, karpellerden daha uzun olduğundan dışardan bakıldığında geriye doğru bükülmüş olarak görülür.<sup>1</sup> Kökleri kuvvetli ve kazık köktür. Köknar türleri genellikle yarı gölge ortamlarda iyi gelişme gösterir. Nemli ve verimli orman topraklarını tercih ederler. Ancak nemli, kumlu veya killi topraklarda da iyi gelişirler. Kireçli topraklardan hoşlanmazlar. Hava bağıl neminin yüksek, yaz aylarının yağışlı ve serin olduğu yerleri severler.<sup>2</sup>

İğneli yapraklar, körpe dallar ve yeşil kozalaklarından dekoksasyon yolu ile faydalanılır, eterik yağ, abietin asiti, kamfen ve tanen içerirler.<sup>1</sup>

Kuzey yarımkürede mutedil (ılıman) iklim bölgelerinin, yüksek dağlık kesimlerinde ve Kuzey Afrika, Himalayalar ve Türkiye’de doğal olarak yetişir. Yaklaşık 45 türü mevcuttur.<sup>2</sup>

Ülkemizde bulunan türleri: Uludağ, Kazdağı, Doğu Karadeniz ve Toros Köknarları’dır.<sup>2</sup>

Doğu Karadeniz Köknarı batıda dekoratif bir ağaç olarak peyzaj düzenlemelerde kullanılır.<sup>9</sup> Bu tür 30m kadar yükselebilen ve kışın yaprak dökmeyen bir ağaçtır. Toros ve Antitoros dağlarında yetişmektedir.<sup>10</sup>

**Halk arasında kullanımı:** Saç dökülmesinde ve nefes darlığında kullanılır, bağışıklık sistemine tonik etkisi olduğuna inanılır. Yaprakları espektoran<sup>4</sup>, balgam sökücü ve kabız<sup>11</sup> etkiye sahiptir, enteritte kullanılır.<sup>4</sup> Yapraklarındaki etkili yağlar sesquiterpen, diterpen, triterpen, flavonoid, kondense tanin, lignan, organik asit ve mum içermektedir.

### 3. 1. 1. 4. Köknar reçinesi

*Abies cilicia* (Ant.et Kotschy) Carr. (*Pinaceae*) türünün kozalakları üzerinde meydana gelen bir reçinedir.

Köknar reçinesi Kahramanmaraş’ın Andırın bölgesindeki ormanlarda elde edilmektedir ve “**Mezde Sakızı, Köknar Sakızı, Mezdeği**” adları verilmektedir. Sonbaharda kozalaklar dağılır ve köknar reçinesi, kozalak pulları ile birlikte ağaçların altına dökülür. Reçine pullardan ayrılarak toplanır.<sup>10</sup>



**Resim 3.4:** Doğal Reçine

Haricen antiseptik ve çıban iyileştirici olarak, yakı veya merhem halinde kullanılmaktadır. Köknar reçinesi çıbanı işletir ve iltihabı dışarı çıkartarak çıbanın iyileşmesini sağlar.<sup>10</sup>



**Resim 3.5:** Dünyanın en yaşlı köknar ağacı.

İsveç'teki Umeaa Üniversitesi araştırmacıları, İsveç'in orta kesimlerinde Dalara'daki Fulu Dağı'nda keşfettikleri köknar ağacının 9 bin 550 yaşında ve dünyanın en yaşlı ağacı olduğunu yazılı açıklamalarında bildirmişlerdir.<sup>12</sup>

### 3. 1. 2. Kullanılan Mikroorganizmalar

Reçinelerin antimikrobiyal aktivitelerini test etmek için kullanılan; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 standart bakteri suşları ile *Candida albicans* klinik izolatu Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümünden temin edildi.

### 3. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

**Antioksidant testler için:** Gallik asit (3,4,5-trihidroksi benzoik asit), Folin & Ciocalteu's Phenol Reaktifi, BHA (bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (bütillenmiş hidroksi toluen), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt), TCA (trikloro asetik asit) ve FeCl<sub>3</sub> (demir(III) klorür), sodyum karbonat (NaCO<sub>3</sub>) etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma'dan, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potassium phoshate monobasic), potasyum ferrisiyanür ve Quercetin dihydrate Fluka'dan, potassium asetate Merck'den, Aluminium Nitrate Aldrich'den, FeCl<sub>2</sub> (ferrous chloride anhydrous), metanol, diklorometan ve n-hexan Riedel-de Haen'den ticari olarak temin edildi.

**Antimikrobiyal test için:** İmipenem (IPM, 10 µg), Ofloksasin (OFX, 5 µg), Netilmisin (NET, 30 µg), Amoksisilin (20 µg)/Klavulonik asit (10 µg) (AMC, 30 µg) içeren standart antibiyotik diskleri ve boş kağıt diskler Oxoid'den ve Amfoterisin B (40 µg) Bristol-Myerss Squibb'den temin edildi.

*E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* standart bakteri suşları için Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar (NA) besiyerleri Difco laboratories, Detroit, Mich.'dan temin edildi. *C. albicans* mayası için ise Sabouraud % 4 Dextrose Agar (SDA) ve Sabouraud % 2 Dextrose Broth (SDB) besiyerleri Oxoid, Ltd, Basingstoke, UK'dan temin edildi.

### **3. 1. 4. Kullanılan Aletler**

UV Spektrofotometresi (T80+ UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd.),Jel görüntüleme sistemi (Bio Rad Gel Doc XR), santrifüj (Centruin 8000 Series), vortex (FISONS Whirli Mixer TM), sterilizatör (Heraeus), otoklav (Nüve EN 400), çalkalayıcı (Julabo SW23), terazi (Mettler Toledo), pH metre (Mettler Toledo), evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), mikropipet (Eppendorf), membran filtresi (Schleicher&Schuell) ve buzdolabı (Arçelik) kullanıldı.

## **3. 2. METOD**

### **3. 2. 1. Antioksidant Aktivitenin Araştırılması**

#### **3. 2. 1. 1. Reçinelerin temizlenmesi, ekstraksiyonu**

Bu çalışmada kullanılan Sedir ve Köknar reçineleri Prof. Dr. Çetin AYTEKİN tarafından Ağustos 2000'de Antalya'da ağaçlardan toplanmak suretiyle temin edildi.

Reçineler ağaç kıymığı ve tozlardan arındırılmak üzere çeker ocak altında, metanol ile çözülerek bucher hunisi ile süzülüler. Reçineler içindeki çözücü rotary evaporator yardımıyla uçuruldu. Reçineler kurutulmak üzere 40°C'de bir gece bekletildikten sonra oda sıcaklığında havanda iyice dövülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen reçinelerden 12'şer gr alınıp 60'şar mL hekzanda 25°C'deki su banyosunda 100 rpm'de 48 saat çalkalandı. Hekzanda çözünen kısım ve çözünmeyen kısımlar bucher hunisi yardımıyla birbirinden ayrıldı, hekzan fazına geçen kısımlara Sedir Hekzan Ekstraktı ve Köknar Hekzan Ekstraktı adı verildi. Hekzanda çözünmeyen kısımlar ise metanolde çözüldü, bunlara da Sedir Metanol Ekstraktı ve Köknar Metanol Ekstraktı adı verildi. Sedir Köknar reçinelerinin metanol ekstraktları için TLC yapılarak kolon kromatografisi için uygun çözücü sistemine karar verildi.

#### **3. 2. 1. 2. Reçine ekstraktlarının kolon kromatografisi ile**

#### **zenginleştirilmesi ve antioksidant aktivitesi yüksek fraksiyonların tayini**

80 cm boyunda ve 3 cm çapındaki kolon 50 cm'ye kadar silika jel 60 ile çözücü olarak hekzan kullanılarak dolduruldu, bir gece bekletildi. Sedir Metanol Ekstraktına sırasıyla diklorometan : metanol (% 95 : % 05, v/v) ve diklorometan : metanol (% 93 : % 07, v/v) çözücü sistemlerinde TLC uygulandı. Bundan sonra



çözücüsü uçurulup toz haline getirilen Sedir Metanol Ekstraktı kolona yüklendi. Kolon sırasıyla aşağıdaki çözücü sistemleri ile yıkandı.

200 mL diklorometan : hekzan (25 : 75, v/v),

200 mL diklorometan : hekzan (50 : 50, v/v),

200 mL diklorometan : hekzan (75 : 25, v/v),

200 mL diklorometan : hekzan (100 : 00, v/v),

100 mL diklorometan : metanol (99 : 01, v/v),

100 mL diklorometan : metanol (98 : 02, v/v),

600 mL diklorometan : metanol (95 : 05, v/v),

200 mL diklorometan : metanol (90 : 10, v/v),

200 mL diklorometan : metanol (80 : 20, v/v),

200 mL diklorometan : metanol (70 : 30, v/v),

200 mL diklorometan : metanol (50 : 50, v/v),

100 mL diklorometan : metanol (25 : 75, v/v),

350 mL diklorometan : metanol (0 : 100, v/v).

Kolondan akan madde yaklaşık 15-20 mL'lik cam tüplerde toplanarak hepsine diklorometan : metanol (% 95 : % 05, v/v) ve diklorometan : metanol (% 93 : % 07, v/v) çözücü sistemlerinde TLC uygulandı. UV lambasında bantlar izlenerek aynı  $R_f$  değerine sahip olan tüp içerikleri birleştirildi, çözücüleri uçurularak tartımları alındı. Bu fraksiyonlara sırasıyla; SFr1, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve SFr6 adı verildi.

Köknar Metanol Ekstraktına TLC yapıldı. Bu işlem yapılırken ekstraktın % 100 hekzan ile diklorometan : hekzan (25 : 75, v/v) çözücü sistemlerinde yürümediği

gözlendi. Bundan dolayı kolon diklorometan : hekzan (50 : 50, v/v) çözücü sistemi ile hazırlanıp bir gece bekletildi. Köknar Metanol Ekstraktının çözücüsü iyice uçuruldu, ekstrakt toz haline getirilip kolona yüklendi. Kolon sırasıyla aşağıdaki çözücü sistemleri ile yıkandı.

- 250 mL diklorometan : hekzan (50 : 50, v/v),
- 200 mL diklorometan : hekzan (75 : 25, v/v),
- 200 mL diklorometan : hekzan (100 : 00, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (99 : 01, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (98 : 02, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (95 : 05, v/v),
- 400 mL diklorometan : metanol (93 : 07, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (90 : 10, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (80 : 20, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (70 : 30, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (50 : 50, v/v),
- 200 mL diklorometan : metanol (25 : 75, v/v),
- 400 mL diklorometan : metanol (0 : 100, v/v).

Kolondan akan madde yaklaşık 15-20 mL'lik cam tüplerde toplanarak hepsine diklorometan : metanol (% 95 : % 05, v/v) ve diklorometan : metanol (% 93 : % 07, v/v) çözücü sistemlerinde TLC uygulandı. UV lambasında bantlar izlenerek aynı  $R_f$  değerine sahip olan tüp içerikleri birleştirildi, çözücüleri uçurularak tartımları

alındı. Bir araya getirilen fraksiyonlara sırasıyla; KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5 adı verildi.

Sedir ve Köknar reçinelerinin bütün ekstrakt ve fraksiyonlarının 250 µg/mL'lik çözeltilerine DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi Testi uygulandı. En iyi aktivite gösteren fraksiyonlar; SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve KFr5 olarak tespit edildi. Bu fraksiyonlar ve sedir ile köknarın metanol ekstraktlarına indirgeme gücü, DPPH ve metal şelatlama aktivitesi testleri uygulandı.

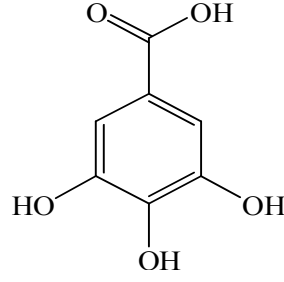
### **3. 2. 1. 3. Stok reçine çözeltilerinin hazırlanması**

Stok reçine çözeltileri, ham reçineler, reçinelerin hekzan ve metanol ekstraktları ve elde edilen bütün fraksiyonların metanol içindeki 2 mg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler ortamda bulunması muhtemel olan safsızlıklardan arındırılmak amacıyla steril 0.45 µm-por çapına sahip membran filtresi ile filtre edildi.

### **3. 2. 1. 4. Toplam fenolik bileşen miktar tayini**

Fenolik bileşikler antioksidant aktivite gösterirler. BHT, quercetin, α-tokoferol ve gallik asit önemli fenolik bileşiklerdir.

Sedir ve Köknar reçinelerinin bütün fraksiyon ve ekstraktlarının 1 mg/mL'lik çözeltileri içindeki toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre tayin edildi.<sup>13</sup> Gallik asit standart fenolik bileşik olarak kullanıldı. Gallik asit; hidroliz olabilen tanenlerden (gallotanen) elde edilen, tıp ve eczacılıktan boya, kimya ve besin endüstrilerine kadar çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarla kullanılan organik bir bileşiktir.<sup>14</sup>

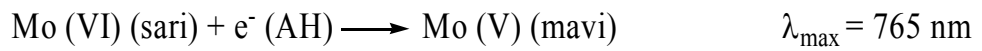


**Şekil 3.1:** Gallik asit molekülü

Gallik asit suda çözünen bir fenolik asittir, üzümde ve birçok bitkinin yaprağında bulunur. Gallik asit esterleri (tanin, katekin, gallate ve alifatik galleteler) *in vitro*'da potansiyel antioksidantlardır. Gallik asitin kendisi de *in vitro*'da antioksidant, antikarsinojenik ve antianjiyogenik aktivite gösterir.<sup>15</sup>

Folin-Ciocaltaeu yönteminde kullanılan fenol reaktifi fenol içermemektedir<sup>14</sup>, fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asit karışımı halinde bulunur.<sup>16</sup> Daha çok fenoller ve fenolik olmayan indirgeme maddeleri ile spektrofotometrik olarak tayin edilebilen kromojen oluşturmak amacıyla tepkimeye girer. Kromatografide sprey reaktifi olarak da kullanılır. Bazik pH'da fosfomolibdik/fosfotungstik asit kompleksleri elektron transferine bağlı olarak indirgenirler, içindeki metalin daha düşük değeriğe sahip olduğu kromojenler oluşur.<sup>14</sup>

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



Folinde aktif merkez Mo(VI)'dir. Antioksidant (AH)'ın bir elektron vermesiyle Mo(VI) Mo(V) indirgenir.

Folin-Ciocaltaeu yönteminin dayandığı temel prensip, gallik asit içindeki fenolik bileşen miktarını gallik asidin artan konsantrasyonuna karşı absorbans grafiğine geçirerek elde edilen standart eğriden yararlanarak reçine çözeltileri içindeki toplam fenolik bileşen miktarını gallik aside eşdeğer olarak hesaplamaktır.

Gallik asitdin 1mg/mL'lik stok çözeltisi metanol içinde hazırlandı. Bundan 50, 100, 150, 200, 250 ve 350 µg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Fraksiyonlandırılmış Sedir ve Köknar Reçinelerinin (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5), ham reçinelerin ve metanol ile hekzan ekstraktlarının 1 mg/mL'lik çözeltileri metanolde hazırlandı. Deney ortamına sırasıyla 40µL gallik asidin farklı konsantrasyonları veya Sedir/Köknar (1 mg/mL) çözeltisi konuldu, hacim saf su ile 1200 µL'ye tamamlandı. Ardından 2N folin reaktifinden 200 µL eklenip iyice çalkalandı ve 25°C'de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 600 µL % 20'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendi, iyice karıştırıldı, 40°C'lik su banyosunda 30 dakika çalkalandı. Spektrofotometre cihazında 765 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Gallik asitin konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Standart eğri çizilerek  $R^2 = 0.9983$  değeri ve aşağıdaki denklem elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0023 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

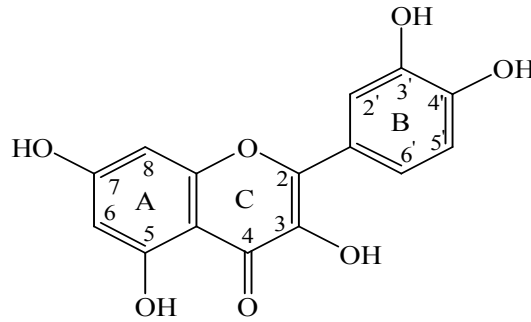
Bu denklem kullanılarak stok reçine çözeltilerinin toplam fenolik bileşen miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı.

### **3. 2. 1. 5. Toplam flavonoid bileşen miktar tayini**

Flavonoidler, “doğanın biyolojik yanıt düzenleyicileri”olarak anılırlar. Bunun nedeni, kanıtlanmış anti-enflamatuar, anti-alerjik, ant-viral ve anti-kanserojenik

özellikleri ile alerjenler, virüsler, karsinojenler gibi diğer bileşiklere karşı vücudun yanıtını düzenleme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bunlarla beraber oksidatif stres ve serbest radikal hasarına karşı belirgin koruma sağlayan güçlü antioksidanlardır. Bu özellikleriyle sekonder bitki fenoliklerinin en yaygın ve en çok bulunan bir sınıfıdır. Flavonoidler aynı zamanda çiçek, sebze ve meyvelere renk veren iyonlarla kompleksleşirler.

Toplam flavonoid bileşen tayini Flavonoid-Alüminyum kompleks oluşumuna dayanarak<sup>17</sup> Moreno, Isla, Sampietro ve Vattvone (2000) tarafından geliştirilen yöntem ile tayin edildi.<sup>18</sup> Standart olarak fenolik bir bileşik olan quercetin kullanıldı. Quercetin'in 3- veya 5-hidroksi grubu ve 4-karbonil grubu ortam ve pH'ya bağlı olarak metal iyonlarıyla ana kompleksleşme noktalarıdır. 3' ve 4' OH grupları asidik ortamda Al(III) ile kompleks oluşturmazlar.<sup>19</sup>



**Şekil 3.2:** Qurcetin molekülü.

Bu yöntemdeki amaç; quercetin'in artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerlerini grafiğe geçirip  $R^{2^2}$ 'yi bulmak, buradan yola çıkarak reçinelerde bulunan toplam flavonoid bileşen miktarını quercetine eşdeğer hesaplamaktır.

Quercetin'in metanol içindeki 500  $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok çözeltisinden 1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 15  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$  ve 45  $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltiler hazırlandı.

Fraksiyonlandırılmış Sedir ve Köknar Reçinelerinin (SFr1,SFr2, SFr3,SFr4 ve SFr5 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5), ham reçinelerin ve metanol ile hekzan ekstraktlarının 2 mg/mL'lik çözeltileri metanolde hazırlandı. Deney ortamına sırasıyla; 0,1 mL % 10 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 0,1 mL 1M CH<sub>3</sub>COOK ve 3,8 mL metanol bırakıldı, ardından 1 mL quercetin veya reçine çözeltisi eklendi karışım iyice karıştırıldıktan sonra 25<sup>0</sup>C su banyosunda 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Artan quercetin konsantrasyonuna bağlı olarak artan sarı renk şiddeti gözlemlendi. UV-VIS spektrofotometresinde 415 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Quercetin'in artan konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi, standart eğri çizilerek R<sup>2</sup>= 0.9993 değeri ve aşağıdaki denklem elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.013 \times \text{quercetin } (\mu\text{g})$$

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

### 3. 2. 1. 6. İndirgeme gücü

Fenton tipi tepkimelerde Fe<sup>+2</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tepkimeye girerek hidroksil radikalini oluştururken kendisi Fe<sup>+3</sup>'e yükseltgenir. OH radikalinin oluşumu lipid peroksidasyonuna, protein modifikasyonuna ve DNA hasarına yol açar. Sedir ve Köknar reçineleri varlığında Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup>'ye dönüşümü Oyaizu metodu (1986) ile incelendi.<sup>20</sup> BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Sedir Metanol Ekstraktı, Köknar Metanol Ekstraktı ile SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve KFr5 fraksiyonlarının ve pozitif kontrollerin 1 mg/mL'lik stok çözeltileri

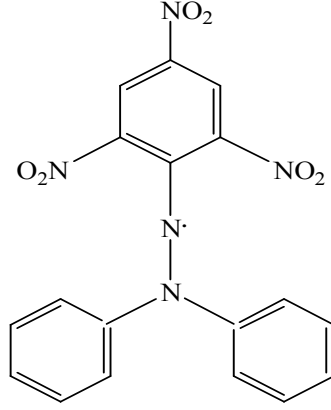
hazırlandı. Bunlardan seri çözeltiler (5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL ve 250 µg/mL) hazırlandı. Test ortamına sırayla 1 mL reçine veya pozitif kontrol çözeltileri, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 mL potasyum ferrisiyanür [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (% 1, w/v) eklendikten sonra bunlar iyice karıştırıldı ve 50°C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu karışıma daha sonra 2.5 mL trikloroasetik asit (TCA, % 10 w/v) ilave edildi, iyice çalkalandıktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakadan 2.5 mL alınıp üzerine sırayla 2.5 mL distile su ve 0.5 mL FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (% 0.1, w/v) ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi, artan konsantrasyonla birlikte sarıdan yeşile dönüşen renk şiddetinde artma gözlemlendi. 700 nm’de absorbans ölçüldü, artan konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi.

Bu testte yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir.

### **3. 2. 1. 7. DPPH radikalini söndürme aktivitesi**

Antioksidant aktiviteyi tayin etmek için kullanılan en eski testtir, ilk olarak 1950’de doğal materyallerdeki H-donörlerini tespit etmek için önerilmiştir. Sonraları hem fenoliklerin hem de yiyeceklerin biyolojik açıdan önemli kısımlarının antioksidant potansiyelini tayin etmek için kullanılmıştır. DPPH testi kararlı serbest radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilin fenoliklerdeki H-donörleri ile tepkime kapasiteleri temeline dayanmaktadır. DPPH görünür bölgede (517 nm) oldukça şiddetli absorpsiyon verir, böylece UV-VIS spektroskopi ile kolayca tespit edilebilir.<sup>21</sup>





**Şekil 3.3:** 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) molekülü.

Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki tepkime, DPPH'in ortamdaki derişiminin azalmasına bu da 517 nm'deki absorbansın düşmesine neden olur. Sonuç olarak, oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H'tır. Bu olay reaksiyon karışımının renginin mordan sarıya dönmesiyle gözlenir.

Sedir ve Köknar reçinelerinin serbest radikal söndürme aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH.) ile Blois (2002) metodu<sup>21</sup> kullanılarak test edildi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sedir Metanol Ekstraktı, Köknar Metanol Ekstraktı, ile SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve KFr5 fraksiyonlarının ve pozitif kontrollerin 1 mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bunlardan seri çözeltiler (5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL) hazırlandı. Metil alkolde hazırlanan 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 mL alınarak üzerine 3 mL reçine veya pozitif kontrol çözeltileri eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Deney ortamında artan konsantrasyona bağlı olarak mordan sarıya dönüşen renk şiddeti izlendi. Spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Bu teste göre daha düşük absorbans daha yüksek aktivite anlamına gelmektedir.

Aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilen sonuçlardan % DPPH Radikalini Söndürme Kapasitesi verileri elde edildi. Bu veriler kullanılarak artan madde derişimlerine karşı % inhibisyon grafiğı çizildi.

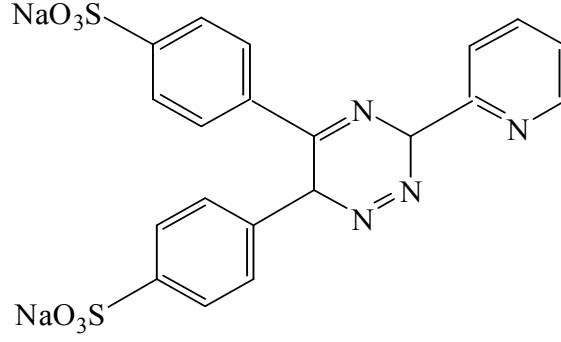
$$\text{DPPH Söndürme Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

$A_0$  = Negatif kontrol numunesinin (DPPH) absorbansı,

$A_1$  = Örnek çözeltilisinin absorbansı.

### **3. 2. 1. 8. Metal şelatlama aktivitesi**

Metal şelatlama aktivitesi metodu,  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarının ferrozine reaktifi tarafından tutulmasına dayanmaktadır. Bu metotta ferrozine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarıyla kompleks oluşturur.<sup>22</sup> Bu kompleks oluşumu metal şelatlayıcı ajanlar varlığında bozular ve sonuç olarak  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozine kompleksi indirgenir. Bu testte, hem flavonoid antioksidantlar hem de standart bileşikler ferrozine reaktifi ile demirli kompleksin oluşumuna engel olurlar. Bunlar şelatlama aktivitesine sahip olup  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarını ferrozineden önce yakalarlar ve inert  $\text{Fe}^{2+}$ -ekstrakt/fraksiyon komplekslerini oluştururlar.<sup>21,22,23</sup>  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozine kompleks bileşiminin indirgenmesine bağlı olarak test ortamındaki mor renk açık sarıya dönüşür. 562 nm dalga boyunda artan derişimle azalan absorbans değerleri elde edilir.



**Şekil 3.4:** Ferrozine molekülü.

Sedir Köknar reçinelerinin metal şelatlama aktivitesi Dinis, Madeira ve Almeida (1994) metodu ile ölçüldü.<sup>22</sup> Güçlü şelatlama aktivitesine sahip olan EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sedir Metanol Ekstraktı, Köknar Metanol Ekstraktı, ile SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve KFr5 fraksiyonlarının ve EDTA'nın 1 mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bunlardan seri çözeltiler (5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL ve 250 µg/mL) hazırlandı. Deney ortamına sırasıyla reçine veya EDTA çözeltisinden 1 mL ve 50 µL 2 mM FeCl<sub>2</sub> eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 200 µL 5mM ferrozine eklendi. Test karışımı iyice çalkaladıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika bekletildi. Artan konsantrasyona bağlı olarak azalan viyole renk şiddeti izlendi. UV-VIS spektrofotometre cihazında 562 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

Aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilen sonuçlardan Fe<sup>+2</sup>-ferrozine kompleksinin inhibisyon yüzdesi verileri elde edildi. Bu veriler kullanılarak artan madde derişimlerine karşı % inhibisyon grafiği çizildi.

$$\text{Metal Şelatlama Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

A<sub>0</sub> = Negatif kontrol numunesinin absorbansı

A<sub>1</sub> = Reçine çözeltisinin absorbansı

### **3. 2. 2. Antimikrobiyal Aktivite**

#### **3. 2. 2. 1. Stok reçine çözeltilerinin hazırlanması**

Stok reçine çözeltileri için; ham reçineler, reçinelerin hekzan ve metanol ekstraktları ve elde edilen bütün fraksiyonlar 4 mg/mL'lik derişimlerde olacak şekilde metanol ile hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler çözünmeyen muhtemel reçine parçalarından arındırmak amacıyla steril 0.45 µm-por çapına sahip membran filtre ile filtre edildi.

#### **3. 2. 2. 2. Disk difüzyon yöntemi**

Bu yöntem klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğunda tercih edilen kalitatif bir yöntemdir. Belirli yoğunluktaki bakteri besiyerine yayılır ve antibiyotik emdirilmiş diskler bunun üzerine yerleştirilir. Bir gecelik inkübasyondan sonra diskin çevresindeki inhibisyon zon çapı ölçülerek (DAD) bakterinin o antibiyotiğe duyarlı olup olmadığı saptanır. Bu testte sonuçlar “duyarlı”, “dirençli” ve “orta dirençli” şeklinde verilmektedir.<sup>24</sup>

#### **3. 2. 2. 3. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve disk difüzyon testinin uygulanması**

Antimikrobiyal aktivite N.C.C.L.S. (National Committee for Clinical Laboratory Standarts) kurallarına göre disk difüzyon testi ile belirlendi.<sup>24</sup> Disk difüzyon testi Muller Hinton Agar ve Sabouraud Dextrose Agar besiyeri kullanılarak yapıldı. Mikroorganizmaların aşılınması işlemi yapılmadan önce katı besiyerleri 35-36°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kullanılan bakteri suşları 20 mL Muller Hinton Broth besiyerinde, maya suşu ise 20 mL Sabouraud Dextrose Broth

besiyerine aşılanarak, 37°C'de 120 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Sterilize edilmiş ve 45-50°C'ye kadar soğutulmuş Müeller-Hinton Agar (MHA, Oxoid) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA)'dan 25'er mL 9 cm çapındaki steril petri kutularına dökülerek düzgün katılaşması sağlandı. Etüvde 37°C'de bir gece bekletildi. Su banyosuna bırakılan bakteri ( $10^8$  adet/mL) ve maya ( $10^7$  adet/mL) suşlarının buyyonlardaki kültürleri alınıp bunlardan 150 µL alınarak steril petri kutularına steril pamuklu çubuklar yardımıyla dağıtıldı. Besiyerine homojen bir şekilde dağılması sağlandı. 6mm'lik steril boş kağıt disklere stok reçine (4 mg/mL) çözeltilerinden 10 µL (40 µg), 15 µL (60 µg) ve 20 µL (80 µg) emdirildi. Reçine çözeltileri emdirilmiş diskler katılaştıran agar üzerine hafifçe bastırılarak aralarında 2 cm kalacak şekilde yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları etüvde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zon çapları mm olarak değerlendirildi. Aynı şartlarda bu test 3 defa tekrarlandı. Standart antibiyotik diskleri kontrol diskleri olarak kullanılır.

### **3. 2. 3. İstatiksel Analiz**

İstatiksel analizler SPSS for 12.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey Testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak belirlendi.

### 3. 3. KAYNAKLAR

1. Yıldırım, A.; Kerim, G. *Bitki Biyolojisi Botanik*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
2. Nebi, B. Toros Sediri'nde (*Cedrus libani* A. Rich.) boy, çap ve hacim için yaşlar arası fenotipik ilişkiler, *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, **2004**, *1*, 12-18.
3. Dığrak, M.; İçlim, A.; Alma, M.H. *Phytotherapy Research*, **1999**, *13*, 584-587.
4. Yeşilada, E.; Gürbüz, İ.; Shibata, H. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, *66*, 289-293.
5. Kızıl, M.; Kızıl, G.; Yavuz, M.; AYTEKİN, Ç. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2002**, *38*, 144-146.
6. Alma, M.H.; Efe, F.T. *Türkiye'de Yetişen Bazı Bitki Türlerine Ait Sakızlardan Elde Edilen Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri, Antioksidant ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, 2003.
7. Baytop, T. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Kitabevi, İstanbul, s:245, 1999-a.
8. Taylor, S. *Bir Gezgin için Türkiye'deki Odunsu Bitkiler Kılavuzu*, Redhouse Yayınevi, İstanbul, Türkiye, 1986.
9. Baytop, T. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Kitabevi, İstanbul, s:277, 1999-b.
10. Coode, M.J.E.; Cullen, J. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, Edit, P. H. Davis, University Pres, Edinburg, 68-72, 1975.

11. Slinkard, K.; Singleton, V.L. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1997**, 28; 49-55.
12. Kara, K. (16.09.2008). Dünya'nın en yaşlı ağacı İsveç'te bulundu. *Kaçkar Gazetesi*, Erişim: <http://www.kackargazetesi.com/haberdetay.asp?ID=348> (24.12.2008).
13. Liu, Z. *Phytother Res.*, **2006**, 20, 806-813.
14. Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.E.; Bektaşoğlu, B., Berker, K.I.; Özyurt, D. *Molecules*, **2007**, 12, 1496-1547.
15. Singleton, V.L; Orthofer, R; Lamuela-Raventos, R.M. *Meth Enzymol* **1999**, 299, 152-178.
16. Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. *Food Chemistry*, **2006**, 97, 654-660.
17. Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarıkürkçü, C.; Öztürk, M.; Ulubelen, A. *Food Chemistry*, **2007**, 103, 816-822.
18. Maalesef, D.; Kuntic, V.J. *Serb. Chem. Soc.*, **2007**, 72, 921-939.
19. Ardestani, A.; Yazdanparast, R. *Food Chemistry*, **2007**, 104, 21-29.
20. Roginsky, V.; Eduardo, A.; Lissi, E.A. *Food Chemistry*, **2005**, 92, 235-254.
21. Kumaran, A.; Karunakaran, R.J. *LWT*, **2007**, 40, 344-352.
22. Singh, R.; Singh, S.; Kumar, S.; Arora, S. *Food chemistry*, **2007**, 103, 1403-1410.
23. Habtemariam, S. *Food Chemistry*, **2007**, 102, 1042-1047.
24. Clark C.L.; Jacobs M.R.; Appelbaum P.C. *Journal Clinic Microbial*, **1998**, 36, 3579-3584.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. TOPLAM FENOLİK BİLEŞEN MİKTAR TAYİNİ

Sedir ve Köknar reçinelerinin bütün fraksiyon ve ekstraktlarının 1 mg/mL'lik çözeltileri içindeki toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre tayin edildi. Gallik asitin 50-350 µg/mL konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlandı, 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.1), aşağıdaki denklem elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0023 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

Bu denklem kullanılarak stok reçine çözeltilerinin toplam fenolik bileşen miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı.

315.51 ± 13.36 µg GAE/mg reçine içeriği ile en fazla toplam fenolik bileşen içeren örneğin Sedir Fraksiyon 2 (SFr2) olduğu belirlendi. Diğer reçinelerde ise sırayla; Sedir (MeOH)'de 216.67 ± 7.56 µg GAE/mg reçine, SFr1'de 186.81 ± 6.03 µg GAE/mg reçine, SFr3'de 157.39 ± 1.74 µg GAE/mg reçine, Sedir (Ham)'da 123.62 ± 6.34 µg GAE/mg reçine, SFr5'de 119.57 ± 3.39 µg GAE/mg reçine, SFr4'de 78.26 ± 4.60 µg GAE/mg reçine, Köknar (Ham)'da 56.52 ± 4.60 µg GAE/mg reçine, Sedir (Heg)'da 49.13 ± 2.85 µg GAE/mg reçine, Köknar (Heg)'da 34.64 ± 5.31 µg GAE/mg reçine, Köknar (MeOH)'de 30.14 ± 4.69 µg GAE/mg reçine, KFr1'de 26.09 ± 2.85 µg GAE/mg reçine, KFr4'de 20.14 ± 2.89 µg GAE/mg reçine, KFr2'de 18.98 ± 1.76 µg GAE/mg reçine, KFr3'de 17.10 ± 3.75 µg GAE/mg reçine ve KFr5'de 14.64 ± 0.50 µg GAE/mg reçine olduğu bulundu (Çizelge 4.7.1).



## 4. 2. TOPLAM FLAVONOİD BİLEŞEN MİKTAR TAYİNİ

Sedir ve Köknar reçinelerinin bütün fraksiyon ve ekstraktlarının 2 mg/mL'lik çözeltileri içindeki toplam flavonoid bileşen miktar tayini Moreno, Isla, Sampietro ve Vattvone (2000) yöntemi ile belirlendi. Quercetin'in 1-45 µg/mL konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlandı, 415 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.2). Aşağıdaki denklem elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.013 \times \text{quercetin } (\mu\text{g})$$

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

4.47 ± 0.07 µg QUE/mg reçine içeriği ile en fazla toplam flavonoid bileşen içeren örneğin Sedir Fraksiyon 5 (SFr5) olduğu belirlendi. Diğer reçinelerde ise sırayla; KFr5'de 2.87 ± 0.03 µg QUE/mg reçine, SFr2'de 2.83 ± 0.06 µg QUE/mg reçine, Sedir (MeOH)'de 1.63 ± 0.07 µg QUE/mg reçine, SFr3'de 1.59 ± 0.16 µg QUE/mg reçine, KFr4'de 1.49 ± 0.06 µg QUE/mg reçine, SFr4'de 1.32 ± 0.07 µg QUE/mg reçine, KFr3'de 1.09 ± 0.01 µg QUE/mg reçine, KFr2'de 0.91 ± 0.03 µg QUE/mg reçine, Köknar (MeOH)'de 0.90 ± 0.02 µg QUE/mg reçine, SFr1'de 0.85 ± 0.01 µg QUE/mg reçine, Sedir (Ham)'da 0.54 ± 0.01 µg QUE/mg reçine, KFr1'de 0.49 ± 0.10 µg QUE/mg reçine, Köknar (Ham)'da 0.41 ± 0.02 µg QUE/mg reçine, Köknar (Heg)'da 0.38 ± 0.41 µg QUE/mg reçine ve Sedir (Heg)'da 0.17 ± 0.02 µg QUE/mg reçine olduğu bulundu (Çizelge 4.7.2).

### 4. 3. İNDİRGEME GÜCÜ

Köknar (MeOH), KFr5, Sedir (MeOH), SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5'in Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgemesi Oyaizu metodu (1986) ile incelendi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Reçinelerin ve pozitif kontrollerin 5-250 µg/mL konsantrasyon aralığında seri çözeltileri hazırlandı. 700 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü, artan konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.3).

Çalışılan konsantrasyon aralığında pozitif kontroller BHA  $0.12 \pm 0.00 - 1.00 \pm 0.02$  arasında ve BHT  $0.11 \pm 0.00 - 0.68 \pm 0.01$  arasında indirgeme gücü gösterdi. Köknar (MeOH)  $0.11 \pm 0.00 - 0.18 \pm 0.01$ , KFr5  $0.12 \pm 0.00 - 0.16 \pm 0.00$ , Sedir (MeOH)  $0.11 \pm 0.00 - 0.28 \pm 0.00$ , SFr2  $0.11 \pm 0.00 - 0.36 \pm 0.00$ , SFr3  $0.12 \pm 0.00 - 0.25 \pm 0.00$ , SFr4  $0.11 \pm 0.01 - 0.19 \pm 0.00$  ve SFr5  $0.13 \pm 0.00 - 0.19 \pm 0.00$  arasında indirgeme gücü gösterdi (Çizelge 4.7.3).

### 4. 4. DPPH RADİKALİNİ SÖNDÜRME AKTİVİTESİ

Köknar (MeOH), KFr5, Sedir (MeOH), SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5'in serbest radikal söndürme aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ile Blois (2002) metodu kullanılarak test edildi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Reçinelerin ve pozitif kontrollerin 5-150 µg/mL konsantrasyon aralığında seri çözeltileri hazırlandı. 517 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Bulunan değerler aşağıdaki eşitlik kullanılarak % DPPH radikalini söndürme aktivitesi olarak hesaplandı. Artan konsantrasyona karşı % DPPH radikalini söndürme aktivitesi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.4).

$$\text{DPPH Söndürme Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

$A_0$  = Negatif kontrol numunesinin (DPPH) absorbansı,

$A_1$  = Örnek çözeltisinin absorbansı.

Çalışılan konsantrasyon aralığında pozitif kontroller BHA  $57.91 \pm 2.00 - 95.34 \pm 0.00$  arasında ve BHT  $20.20 \pm 1.29 - 92.51 \pm 0.98$  arasında % inhibisyon gösterdi. Köknar (MeOH)  $4.94 \pm 3.42 - 16.67 \pm 2.48$ , KFr5  $9.89 \pm 1.91 - 65.96 \pm 2.69$ , Sedir (MeOH)  $17.51 \pm 1.60 - 90.39 \pm 4.91$ , SFr2  $26.69 \pm 4.04 - 92.10 \pm 3.78$ , SFr3  $12.29 \pm 1.69 - 85.45 \pm 1.96$ , SFr4  $5.79 \pm 1.96 - 83.48 \pm 0.00$  ve SFr5  $8.62 \pm 0.98 - 81.92 \pm 0.24$  arasında % inhibisyon gösterdi (Çizelge 4.7.4).

#### 4. 5. METAL ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Köknar (MeOH), KFr5, Sedir (MeOH), SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5'in metal şelatlama aktivitesi Dinis, Madeira ve Almeida (1994) metodu ile değerlendirildi. Bu aktiviteyi sadece Köknar (MeOH), KFr5, SFr4 ve SFr5 gösterdi. EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Reçinelerin ve pozitif kontrolün 5-250 µg/mL konsantrasyon aralığında seri çözeltileri hazırlandı. 562 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Bulunan değerler aşağıdaki eşitlik kullanılarak % metal şelatlama aktivitesi olarak hesaplandı. Artan konsantrasyona karşı % metal şelatlama aktivitesi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.5).

$$\text{Metal Şelatlama Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

$A_0$  = Negatif kontrol numunesinin absorbansı

$A_1$  = Reçine çözeltisinin absorbansı

Çalışılan konsantrasyon aralığında EDTA  $28.12 \pm 0.66 - 98.95 \pm 0.03$ , Köknar (MeOH)  $0.00 \pm 0.00 - 8.39 \pm 0.17$ , KFr5  $0.00 \pm 0.00 - 63.06 \pm 0.78$ , SFr4  $0.00 \pm 0.00 - 6,53 \pm 1.82$  ve SFr5  $0.00 \pm 0.00 - 28.29 \pm 1.69$  aralığında % metal şelatlama aktivitesi gösterdi (Çizelge 4.7.5).

#### 4. 6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE

Sedir ve Köknar reçinelerinin antimikrobiyal aktivitelerini disk diffüzyon yöntemi ile test etmek için; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pyogenes* standart bakteri suşları ile *Candida albicans* klinik izolatu ve İmipenem (IPM, 10 µg), Ofloksasin (OFX, 5 µg), Netilmisin (NET, 30 µg), Amoksisilin (AMC, 20 µg) ile Amfoterisin B (40 µg) standart antibiyotikleri kullanıldı. Bu antibiyotiklerin gösterdiği inhibisyon zon çapları şöyledir; IPM standart antibiyotiğinin *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *S. pyogenes* mikroorganizmalarına karşı sırasıyla 28 mm, >30 mm, 24 mm, >>30 mm ve >>30 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. OFX antibiyotiği bu mikroorganizmalara karşı sırasıyla 30 mm, 22 mm, 18 mm, 30 mm ve 22 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. NET antibiyotiği sırasıyla 28 mm, 28 mm, 22 mm, >30 mm ve > 30 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. AMC antibiyotiği sırasıyla 20 mm, >30 mm, *P. aeruginosa* AMC'ye karşı direnç gösterdi, 30 mm ve 24 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. Amfoterisin B antibiyotiği *C. albicans* klinik izolatına karşı 12 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu (Çizelge 4.7.6-Çizelge 4.7.7).

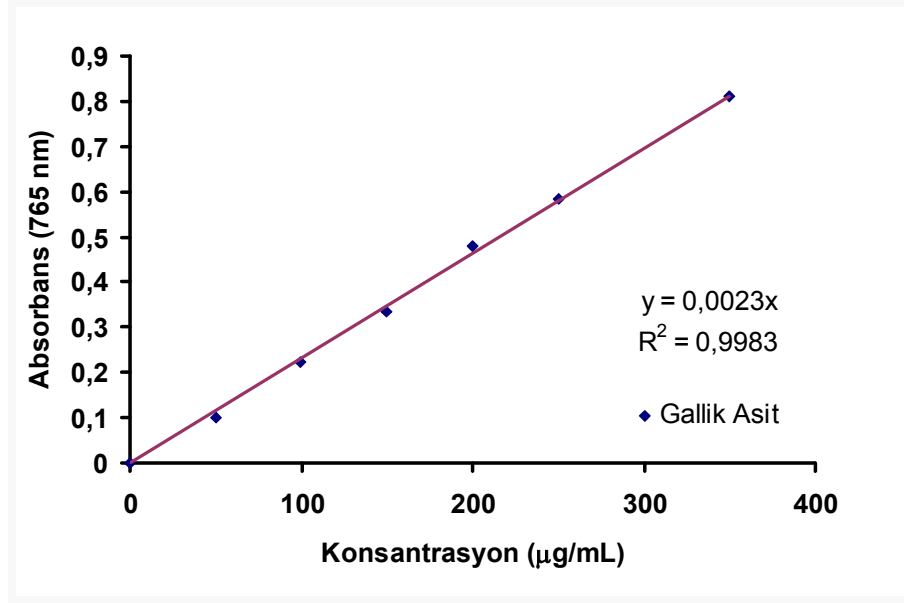
Sedir reçinesinin bütün fraksiyon ve ekstraktlarının bu mikroorganizmaların büyümesi üzerindeki durdurucu etkisinin verileri Çizelge 4.7.6'da verilmektedir. Çizelgede görüldüğü gibi sedir reçinesinin 40 µg'lık denemelerinde sadece SFr1 *P.*

*aeruginosa* bakterisi üzerinde 8 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. Reçinenin 60 µg'lık denemelerinde ise sedir (Ham) reçinesi *B. subtilis* üzerinde 12 mm, sedir (MeOH) *E. coli* üzerinde 8 mm ve SFr1 *P. aeruginosa* üzerinde 8 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. 80 µg'lık denemelerde ise sedir reçinesinin bütün ekstrakt ve fraksiyonları 8-16 mm arasında değişen inhibisyon zon çapları oluşturdu.

Köknar reçinesinin bütün fraksiyon ve ekstraktlarının bu mikroorganizmaların büyümesi üzerindeki durdurucu etkisinin verileri Çizelge 4.7.7'de verilmektedir. Çizelgede görüldüğü gibi köknar reçinesinin 40 µg'lık denemelerinde köknar (Ham) reçinesi *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde 8 mm, köknar (MeOH) ekstraktı ve KFr2 aynı bakteri üzerinde 8 mm ve KFr1 yine aynı bakteri üzerinde 10 mm inhibisyon zon çapı oluşturdu. Reçinenin 60 µg'lık denemelerinde ise KFr3 ve KFr4 dışındaki bütün ekstrakt ve fraksiyonlar farklı mikroorganizmalara karşı 8-10 mm arasında değişen inhibisyon zon çapları oluşturdu. 80 µg'lık denemelerde ise köknar reçinesinin bütün ekstrakt ve fraksiyonları 8-16 mm arasında değişen inhibisyon zon çapları oluşturdu (Resim 4.7.1-4.7.16).

Ayrıca test edilen bakterilerden *P. aeruginosa*'nın amoksisiline karşı dirençli olduğu tespit edildi.

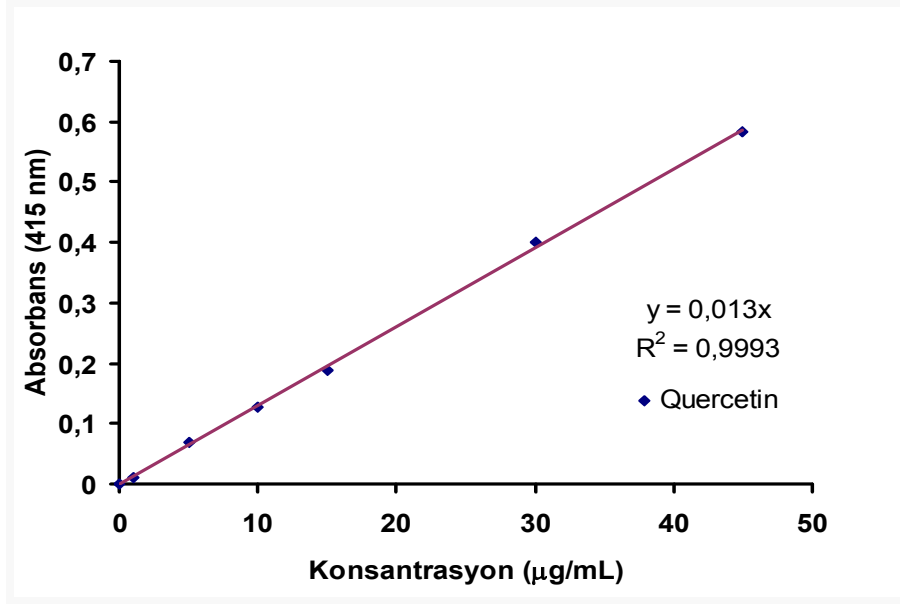
#### **4. 7. ÇİZELGELER, ŞEKİLLER, RESİMLER**



**Şekil 4.7.1:** Gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri.

**Çizelge 4.7.1:** Sedir ve Köknar reçinelerinin içindeki gallik aside eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları. Her değer üç (n=3) deney sonucunun ortalaması alınarak ve  $\pm$  standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.

TOPLAM FENOLİK BİLEŞEN	
Madde	Gallik Asit Eşdeğeri (µg GAE /mg reçine)
Sedir (Ham)	123.62 $\pm$ 6.34
Sedir (MeOH)	216.67 $\pm$ 7.56
Sedir (Heg)	49.13 $\pm$ 2.85
SFr1	186.81 $\pm$ 6.03
SFr2	315.51 $\pm$ 13.36
SFr3	157.39 $\pm$ 1.74
SFr4	78.26 $\pm$ 4.60
SFr5	119.57 $\pm$ 3.39
Köknar (Ham)	56.52 $\pm$ 4.60
Köknar (MeOH)	30.14 $\pm$ 4.69
Köknar (Heg)	34.64 $\pm$ 5.31
KFr1	26.09 $\pm$ 2.85
KFr2	18.98 $\pm$ 1.76
KFr3	17.10 $\pm$ 3.75
KFr4	20.14 $\pm$ 2.89
KFr5	14.64 $\pm$ 0.50

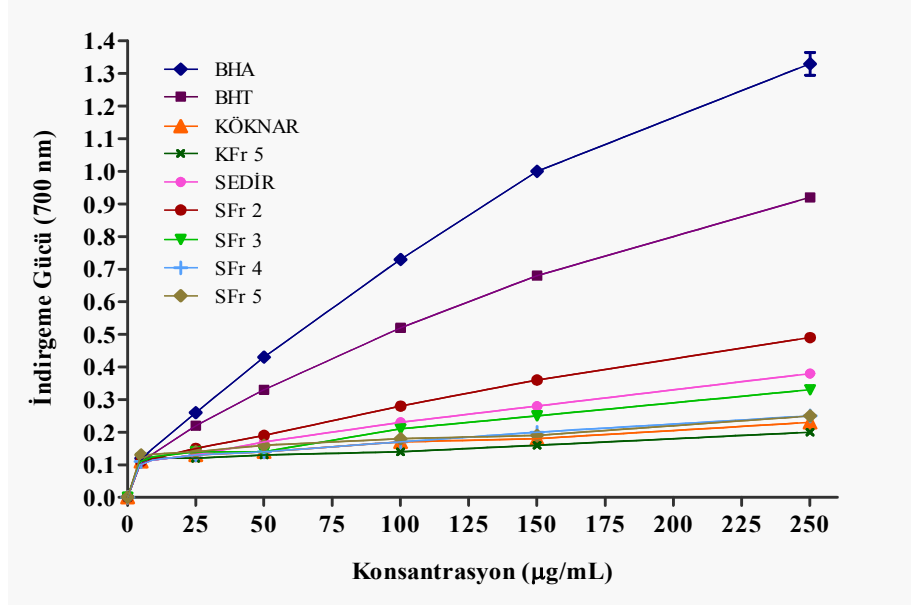


**Şekil 4.7.2:** Quercetininin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri.

**Çizelge 4.7.2:** Sedir ve Köknar reçineleri içindeki quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları. Her değer üç (n=3) deney sonucunun ortalaması alınarak ve  $\pm$  standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.

TOPLAM FLAVONOİD BİLEŞEN	
Madde	Quercetin Eşdeğeri (µg QUE /mg reçine)
Sedir (Ham)	0.54 $\pm$ 0.01
Sedir (MeOH)	1.63 $\pm$ 0.07
Sedir (Heg)	0.17 $\pm$ 0.02
SFr1	0.85 $\pm$ 0.01
SFr2	2.83 $\pm$ 0.06
SFr3	1.59 $\pm$ 0.16
SFr4	1.32 $\pm$ 0.07
SFr5	4.47 $\pm$ 0.07
Köknar (Ham)	0.41 $\pm$ 0.02
Köknar (MeOH)	0.90 $\pm$ 0.02
Köknar (Heg)	0.38 $\pm$ 0.41
KFr1	0.49 $\pm$ 0.10
KFr2	0.91 $\pm$ 0.03
KFr3	1.09 $\pm$ 0.01
KFr4	1.49 $\pm$ 0.06
KFr5	2.87 $\pm$ 0.03





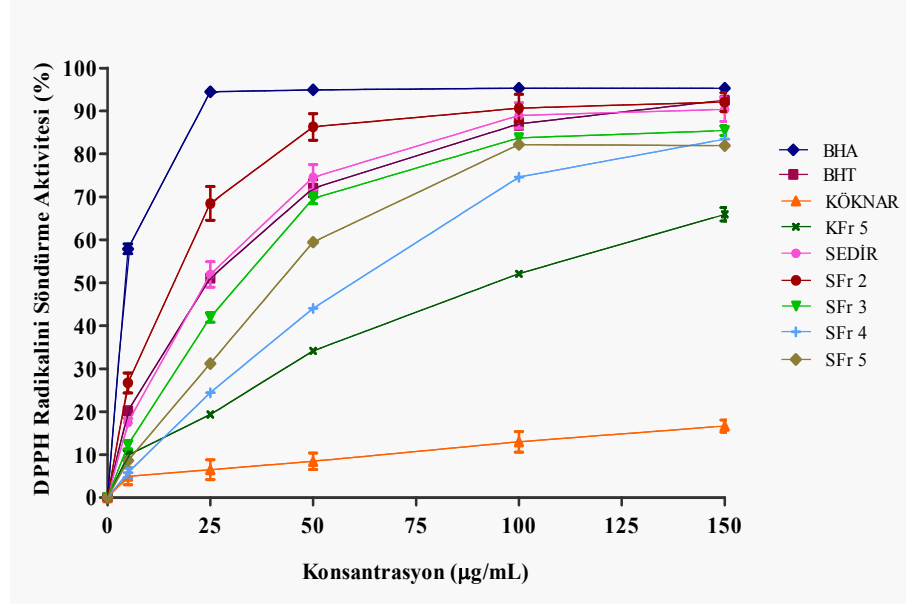
Şekil 4.7.3: Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.7.3: Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p<0.05).

	KONSANTRASYON ARALIĞI (µg/mL)				
	5	25	50	100	150
BHA	0.12 ± 0.00	0.26 ± 0.00	0.43 ± 0.01	0.73 ± 0.00	1.00 ± 0.02
BHT	0.11 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.52 ± 0.01	0.68 ± 0.01
KÖKNAR	0.11 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01
KFr5	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.16 ± 0.00
SEDİR	0.11 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.00
SFr2	0.11 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.36 ± 0.00
SFr3	0.12 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.25 ± 0.00
SFr4	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.19 ± 0.00
SFr5	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.19 ± 0.00

KÖKNAR: Köknar (MeOH), SEDİR: Sedir (MeOH)



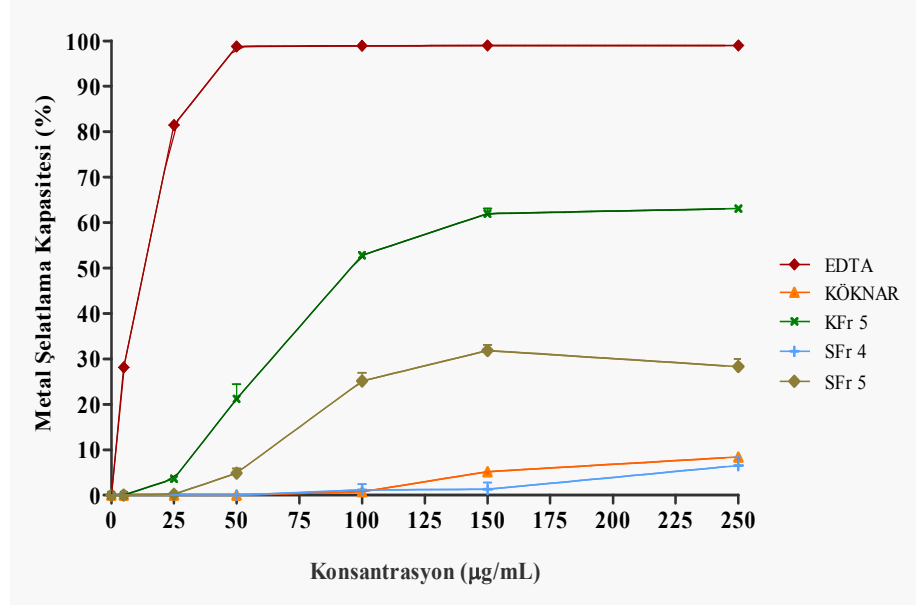
**Şekil 4.7.4:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini söndürme aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

**Çizelge 4.7.4:** Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini söndürme aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve  $\pm$  standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ( $p>0.05$ ).

	KONSANTRASYON ARALIĞI (µg/mL)				
	5	25	50	100	150
BHA	57.91±2.00	94.49 ± 0.00	94.91± 0.00	95.34 ± 0.00	95.34 ± 0.00
BHT	20.20±1.29	51.13 ± 1.22	72.03 ± 3.39	87.00 ± 2.09	92.51 ± 0.98
KÖKNAR	4.94 ± 3.42	6.50 ± 4.01	8.47 ± 3.36	12.99 ± 4.18	16.67 ± 2.48
KFr5	9.89 ± 1.91	19.35 ± 1.29	34.18 ± 0.49	52.12 ± 0.73	65.96 ± 2.69
SEDİR	17.51±1.60	51.98 ± 5.13	74.58 ±5.15	88.98 ± 5.14	90.39 ± 4.91
SFr2	26.69±4.04	68.50 ± 6.85	86.30 ± 5.38	90.68 ± 5.51	92.10 ± 3.78
SFr3	12.29±1.69	41.95 ± 1.94	69.63 ± 2.13	83.76 ± 0.24	85.45 ± 1.96
SFr4	5.79 ± 1.96	24.44 ± 0.24	44.07 ± 0.00	74.59 ± 1.49	83.48 ± 0.00
SFr5	8.62 ± 0.98	31.21 ± 0.49	59.46 ± 1.22	82.20 ± 0.00	81.92 ± 0.24

*KÖKNAR: Köknar (MeOH), SEDİR: Sedir (MeOH)*



Şekil 4.7.5: Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.7.5: Sedir ve Köknar reçinelerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucu ortalamasıdır ve  $\pm$  standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ( $p < 0.05$ ).

	KONSANTRASYON ARALIĞI (µg/mL)					
	5	25	50	100	150	250
EDTA	28.12 $\pm$ 0.66	81.44 $\pm$ 1.12	98.76 $\pm$ 0.13	98.91 $\pm$ 0.10	98.97 $\pm$ 0.00	98.95 $\pm$ 0.03
KÖKNAR	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.76 $\pm$ 0.43	5.17 $\pm$ 0.07	8.39 $\pm$ 0.17
KFr5	0.00 $\pm$ 0.00	3.63 $\pm$ 0.18	21.22 $\pm$ 3.22	52.79 $\pm$ 0.53	61.97 $\pm$ 1.12	63.06 $\pm$ 0.78
SFr4	0.00 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.10	0.00 $\pm$ 0.00	1.16 $\pm$ 1.24	1.29 $\pm$ 1.49	6.53 $\pm$ 1.82
SFr5	0.00 $\pm$ 0.00	0.21 $\pm$ 0.27	4.85 $\pm$ 1.02	25.11 $\pm$ 1.81	31.86 $\pm$ 1.19	28.29 $\pm$ 1.69

KÖKNAR: Köknar (MeOH)

**Çizelge 4.7.6:** Sedir (*Cedrus libani*) ve fraksiyonlarının mikroorganizmaların büyümeleri üzerinde engelleme etkisi.

ZON ÇAPLARI (mm) KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR							
Denenen Madde	µg / kağıt disk	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. pyogenes</i> ATCC19615	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC11774
İmipenem	10	28	>30	>>30	24	t.e	>>30
Ofloksasin	5	30	22	22	18	t.e	30
Netilmisin	30	28	28	>30	22	t.e	>30
Amoksisilin	20	20	>30	24	D	t.e	30
Amfoterisin B	40	t.e	t.e	t.e	t.e	12	t.e
Sedir (Ham)	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	12
	80	10	14	14	10	8	16
Sedir (Heg)	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	14	-	-	14
Sedir(MeOH)	40	-	-	-	-	-	-
	60	8	-	-	-	-	-
	80	8	-	10	-	-	14
SFr1	40	-	-	-	8	-	-
	60	-	-	-	8	-	-
	80	-	10	10	8	10	-
SFr2	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	10	8	14	-	-	12
SFr3	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	8	8	12	-	8	16
SFr4	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	8	-	12	-	10	14
SFr5	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	10	-	10	-	-	10
SFr6	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	16

**t.e** : test edilmedi; **D**: dirençli; - : etkili değil;

**ATCC** : Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

**Sedir (Ham)**: Ham Sedir Reçinesi; **Sedir (Heg)**: Sedirin hekzan ekstraktı;

**Sedir (MeOH)**: Sedirin metanol ekstraktı; **SFr1**: Sedirin metanol ekstraktının 1. fraksiyonu; **SFr2**: Sedirin metanol ekstraktının 2. fraksiyonu; **SFr3**: Sedirin metanol ekstraktının 3. fraksiyonu; **SFr4**: Sedirin metanol ekstraktının 4. fraksiyonu; **SFr5**: Sedirin metanol ekstraktının 5. fraksiyonu; **SFr6**: Sedirin metanol ekstraktının 6. fraksiyonu.

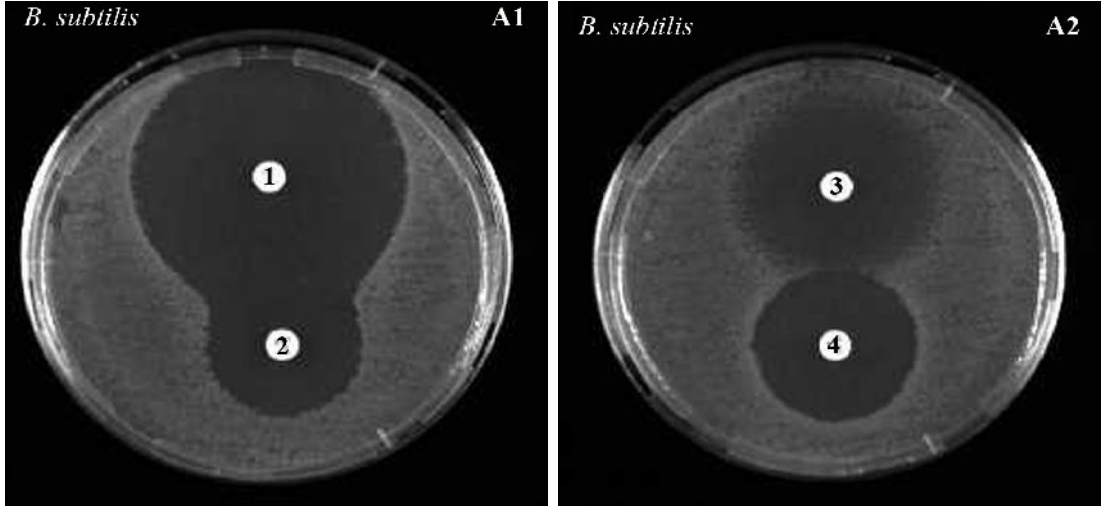
**Çizelge 4.7.7:** Köknar (*Abies cilicia*) ve fraksiyonlarının mikroorganizmaların büyümeleri üzerinde engelleme etkisi.

ZON ÇAPLARI (mm) KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR							
Denenen Madde	µg / kağıt disk	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. pyogenes</i> ATCC19615	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC11774
İmipenem	10	28	>30	>>30	24	t.e	>>30
Ofloksasin	5	30	22	22	18	t.e	30
Netilmisin	30	28	28	>30	22	t.e	>30
Amoksisilin	20	20	>30	24	D	t.e	30
Amfoterisin B	40	t.e	t.e	t.e	t.e	12	t.e
Köknar (Ham)	40	-	-	-	8	-	-
	60	-	-	-	8	-	10
	80	8	12	-	12	8	12
Köknar (Heg)	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	10
	80	10	16	-	8	10	12
Köknar(MeOH)	40	-	-	-	8	-	-
	60	-	-	-	10	-	-
	80	8	12	-	12	10	-
KFr1	40	-	-	-	10	-	-
	60	-	-	-	10	-	-
	80	8	14	-	12	10	10
KFr2	40	-	-	-	8	-	-
	60	-	-	-	8	-	8
	80	8	12	-	10	10	10
KFr3	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	12	14	10	10	10	12
KFr4	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
	80	10	14	10	-	10	12
KFr5	40	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	10
	80	10	12	10	-	12	12

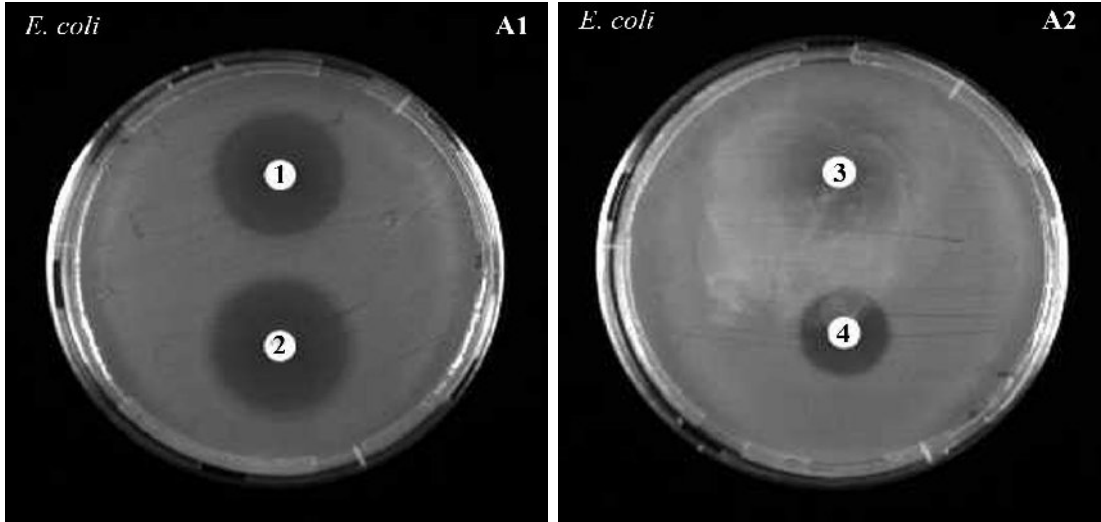
**t.e:** test edilmedi; **D:** dirençli; **-:** etkili değil;

**ATCC :** Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

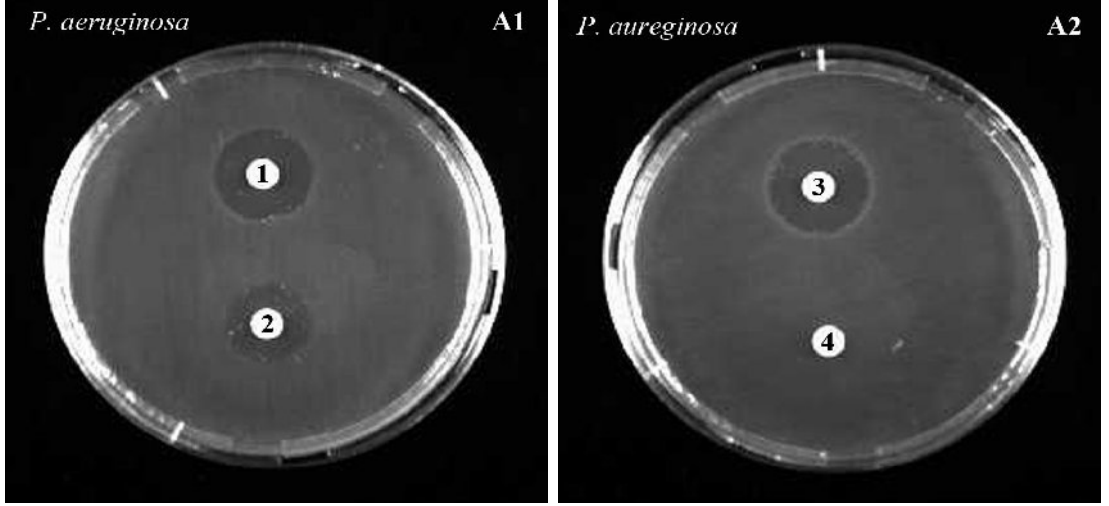
**Köknar (Ham):** Ham Köknar Reçinesi; **Köknar (Heg):** Köknarın hekzan ekstraktı; **Köknar (MeOH):** Köknarın metanol ekstraktı; **KFr1:** Köknarın metanol ekstraktının 1. fraksiyonu; **KFr2:** Köknarın metanol ekstraktının 2. fraksiyonu; **KFr3:** Köknarın metanol ekstraktının 3. fraksiyonu; **KFr4:** Köknarın metanol ekstraktının 4. fraksiyonu; **KFr5:** Köknarın metanol ekstraktının 5. fraksiyonu



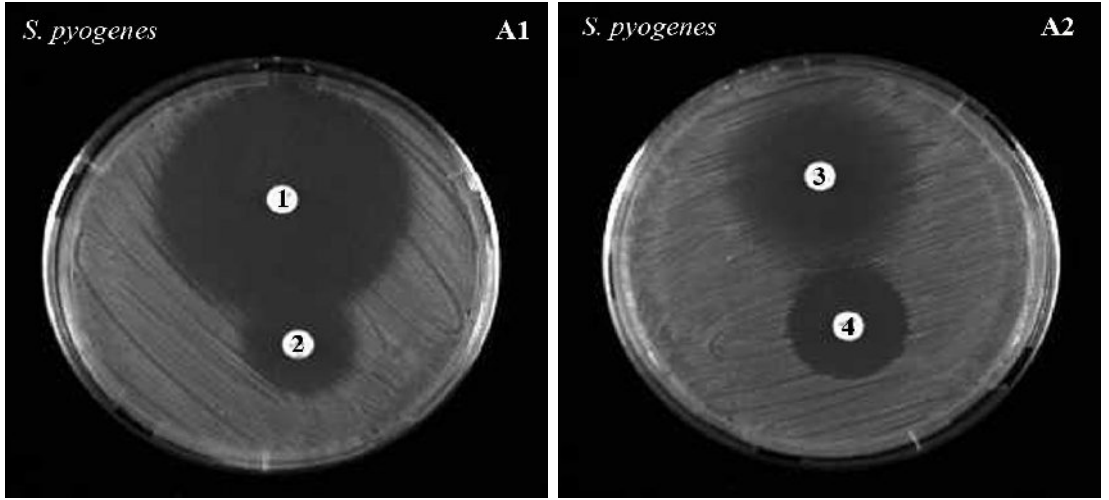
**Resim 4.7.1:** Çeşitli antibiyotiklerin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
A1) Antibiyotikler **1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)  
A2) Antibiyotikler **3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)



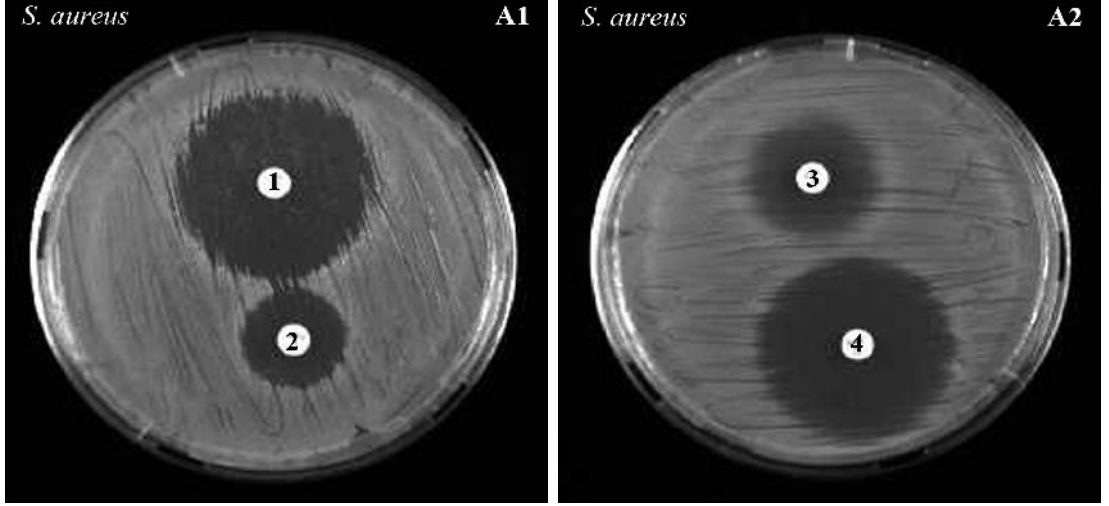
**Resim 4.7.2:** Çeşitli antibiyotiklerin *E. coli* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
A1) Antibiyotikler **1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)  
A2) Antibiyotikler **3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)



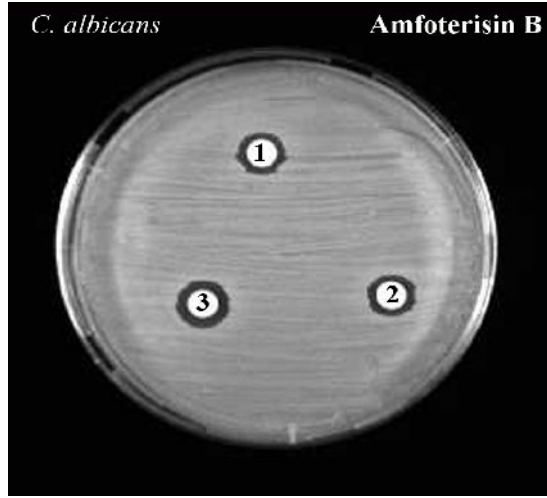
**Resim 4.7.3:** Çeşitli antibiyotiklerin *P. aureginosa* üremesi üzerine engelleyici etkisi. **A1)** Antibiyotikler **1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk) **A2)** Antibiyotikler **3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)



**Resim 4.7.4:** Çeşitli antibiyotiklerin *S. pyogenes* üremesi üzerine engelleyici etkisi. **A1)** Antibiyotikler **1:** Imipenem (10 µg/kağıt disk), **2:** Ofloksasin (5 µg/kağıt disk) **A2)** Antibiyotikler **3:** Netilmisin (30 µg/kağıt disk), **4:** Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)

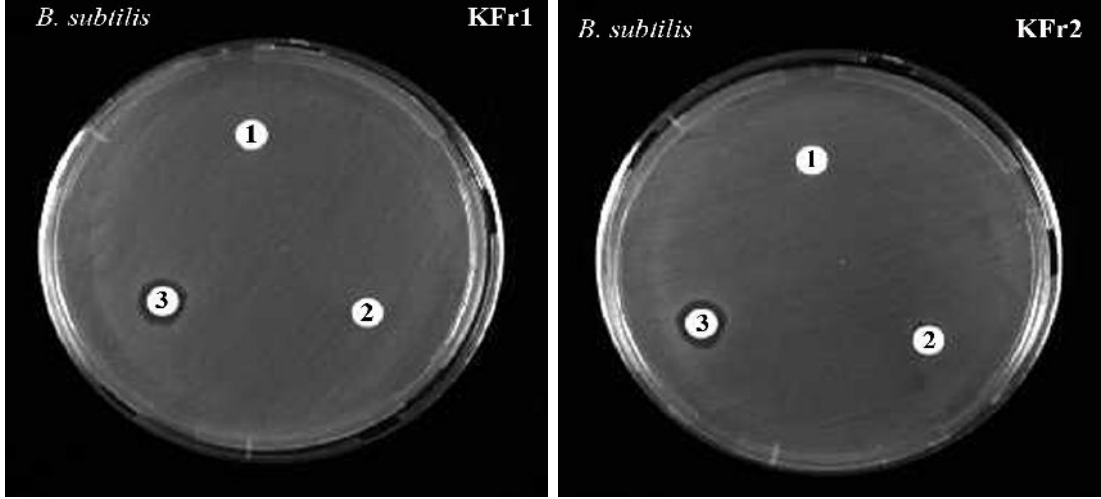


**Resim 4.7.5:** Çeşitli antibiyotiklerin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
A1) Antibiyotikler1: Imipenem (10 µg/kağıt disk), 2: Ofloksasin (5 µg/kağıt disk)  
A2) Antibiyotikler3: Netilmisin (30 µg/kağıt disk), 4: Amoksisilin (20 µg/kağıt disk)

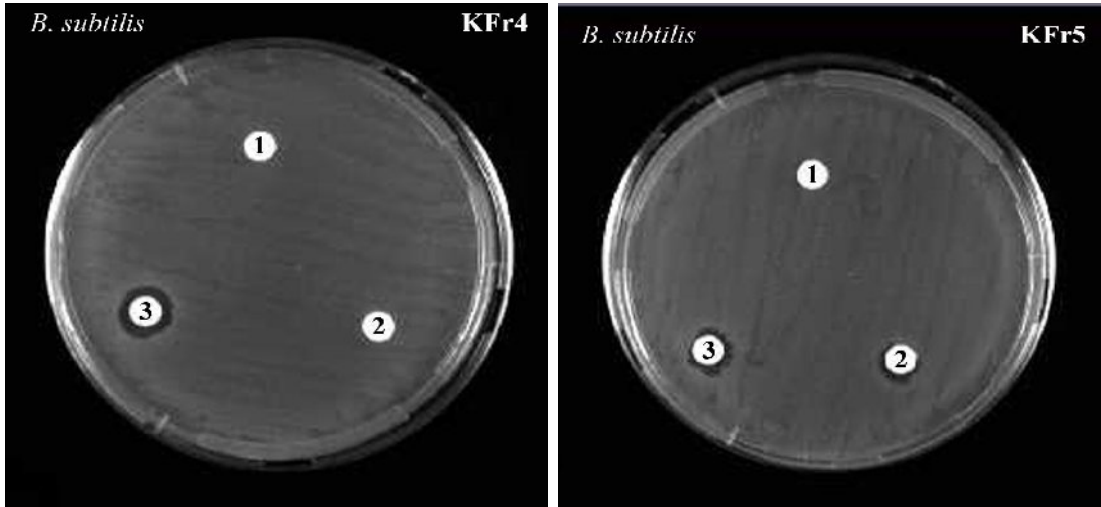


**Resim 4.7.6:** Amfoterisin B'nin *C. Albicans* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
1:10 µg/kağıt disk 2: 20 µg/kağıt disk 3: 40 µg/kağıt disk

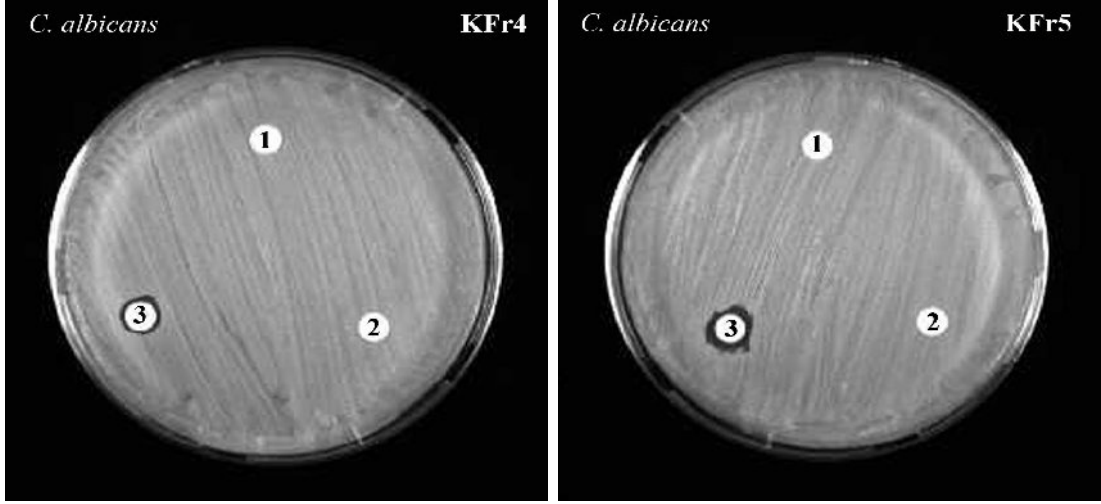




**Resim 4.7.7:** Köknar reçinesinin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
KFr1 : Köknar Metanol Ekstraktının 1. Fraksiyonu  
KFr2 : Köknar Metanol Ekstraktının 2. Fraksiyonu  
1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk



**Resim4.7.8:** Köknar reçinesinin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
KFr4 : Köknar Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu  
KFr5 : Köknar Metanol Ekstraktının 5. Fraksiyonu  
1: 40 µg reçine/kağıt disk 2 : 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

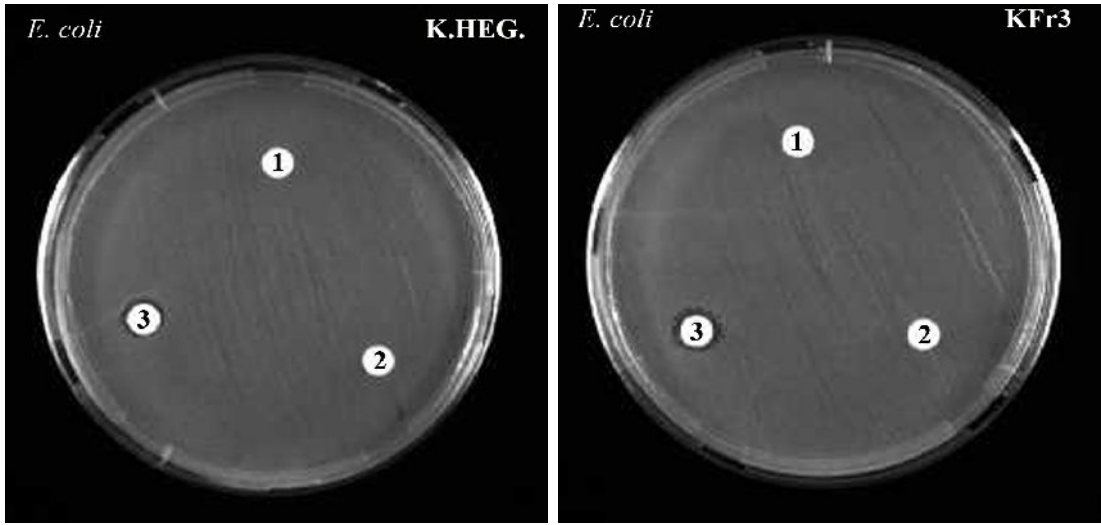


**Resim 4.7.9:** Köknar reçinesinin *C. albicans* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

KFr4 : Köknar Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

KFr5 : Köknar Metanol Ekstraktının 5. Fraksiyonu

1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

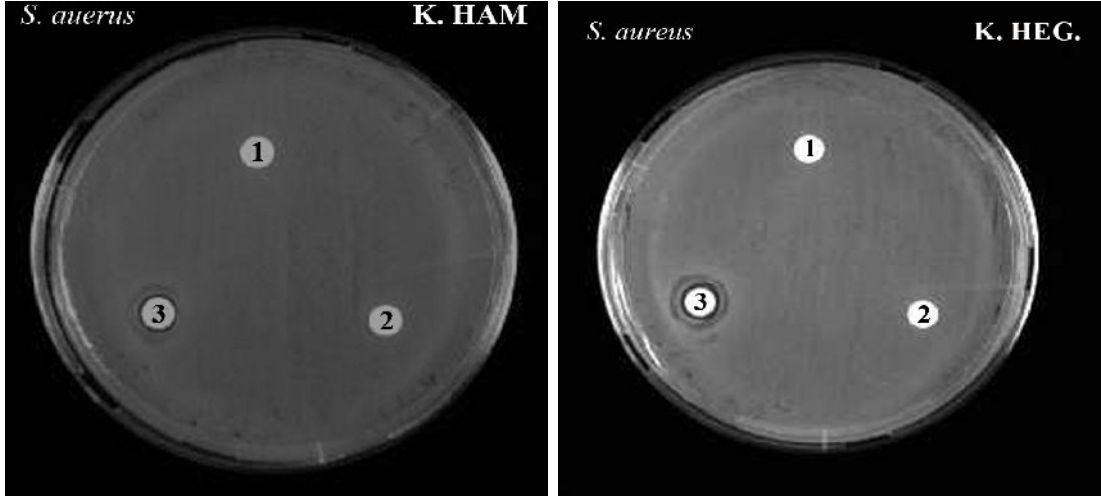


**Resim 4.7.10:** Köknar reçinesinin *E. coli* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

K.HEG. : Köknar Hekzan Ekstraktı

KFr3 : Köknar Metanol Ekstraktının 3. Fraksiyonu

1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

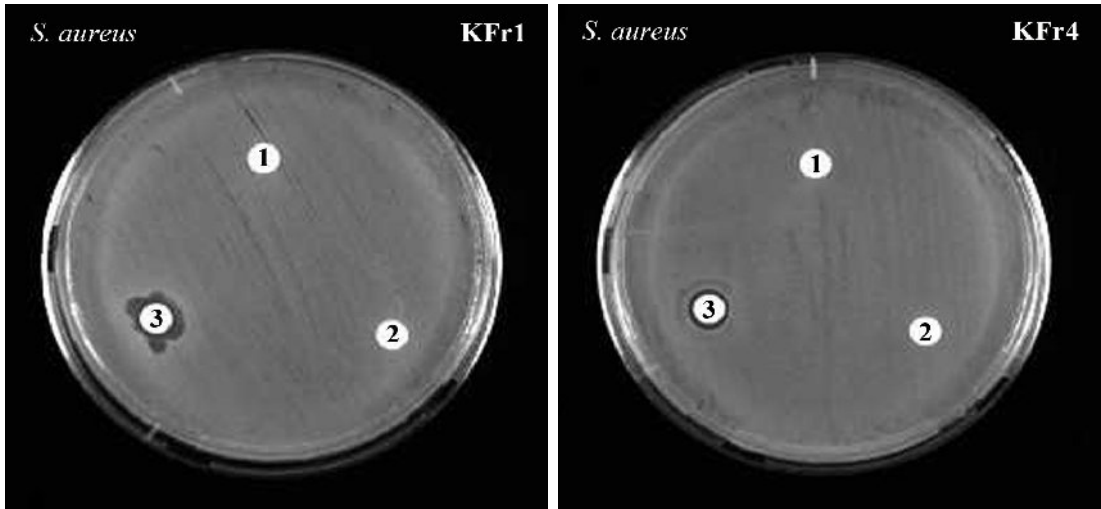


**Resim 4.7.11:** Köknar reçinesinin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

K.HAM : Köknar Ham Reçinesi

K.HEG. : Köknar Hekzan Ekstraktı

1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

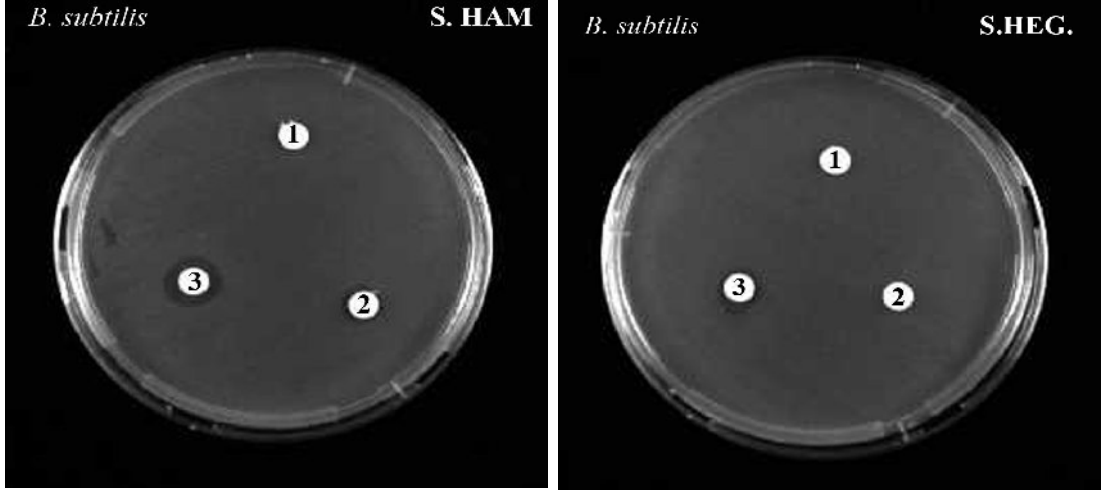


**Resim 4.7.12:** Köknar reçinesinin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

KFr1 : Köknar Metanol Ekstraktının 1. Fraksiyonu

KFr4 : Köknar Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

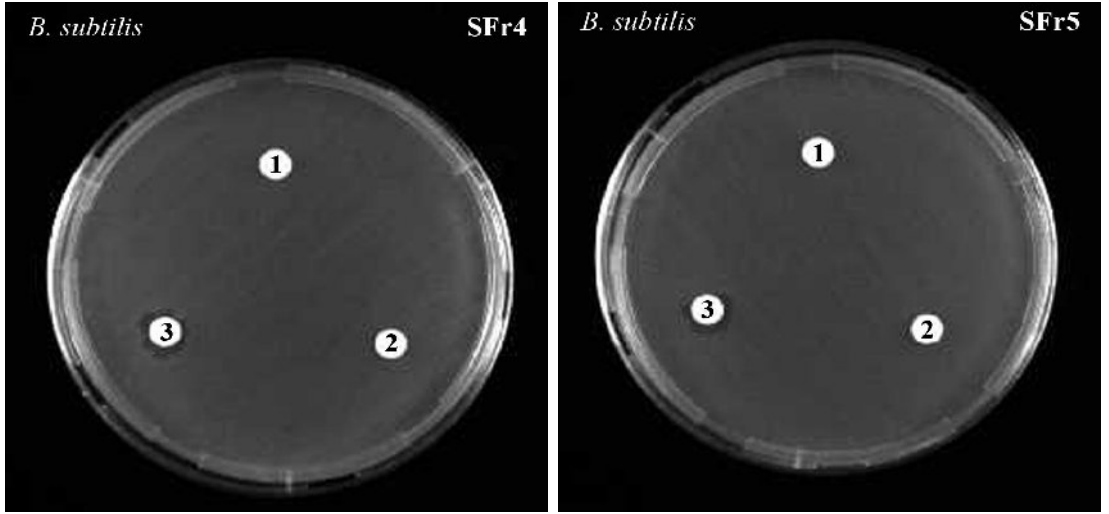


**Resim 4.7.13:** Köknar reçinesinin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

S.HAM : Sedir Ham Reçinesi

S.HEG. : Sedir Hekzan Ekstraktı

1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

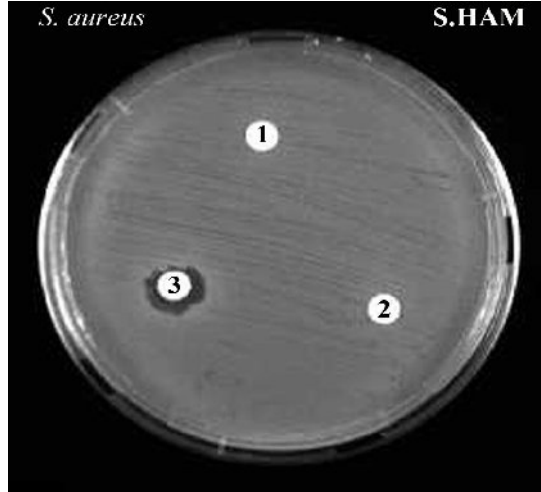


**Resim 4.7.14:** Sedir reçinesinin *B. subtilis* üremesi üzerine engelleyici etkisi.

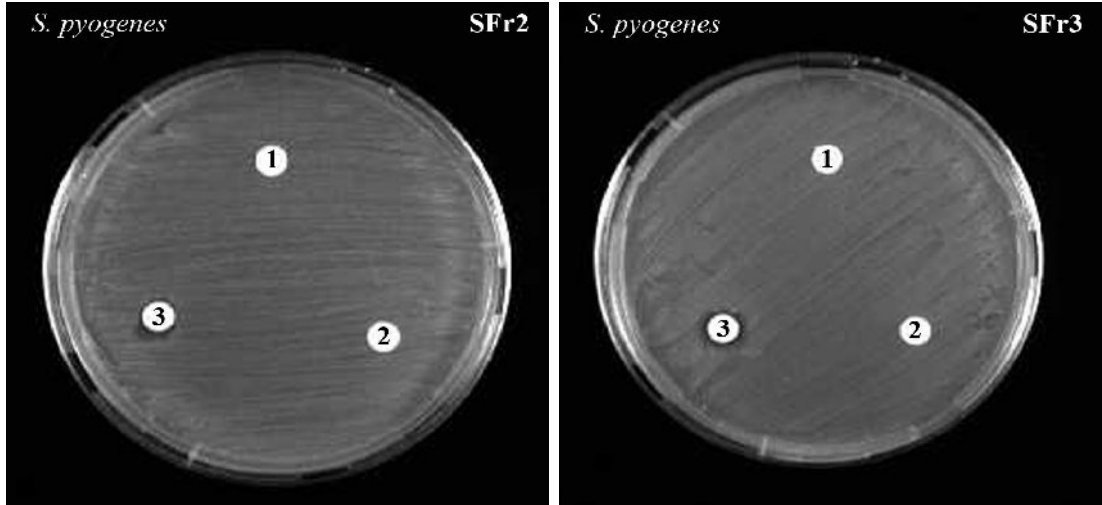
SFr4 : Sedir Metanol Ekstraktının 4. Fraksiyonu

SFr5 : Sedir Metanol Ekstraktının 5. Fraksiyonu

1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk



**Resim 4.7.15:** Sedir reçinesinin *S. aureus* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
S.HAM : Sedir Ham Reçinesi  
1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk



**Resim 4.7.16:** Sedir reçinesinin *S. pyogenes* üremesi üzerine engelleyici etkisi.  
SFr2 : Sedir Metanol Ekstraktının 2. Fraksiyonu  
SFr3 : Sedir Metanol Ekstraktının 3. Fraksiyonu  
1: 40 µg reçine/kağıt disk 2: 60 µg reçine/kağıt disk 3: 80 µg reçine/kağıt disk

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipid oksidasyonu, gıdaların imalatı ve saklanması sırasında bozulmalarına neden olan en önemli etkidir. Yükseltgenmiş doymamış yağ asitleri yaşlanma ve karsinogeneze neden olabilmektedir. Gıdaların imalatı sırasında yaygın olarak kullanılan BHT ve BHA gibi sentetik antioksidant bileşiklerin biyolojik yan etkileri bulunmaktadır. Bu maddelerle korunmuş gıdaların tüketimlerinin karaciğer hastalıkları ile karsinogeneze neden olduğu bildirilmektedir.<sup>1</sup> Bundan dolayı, doğal kaynaklardan elde edilen başlıca alternatif antioksidantlar önem taşımaktadır. Doğal antioksidantlar biyolojik fonksiyon olarak sağlığa olumlu etkiler göstermektedirler. Bunlar DNA hasarı, mutagenesis, karsinogenesis gibi bazı kronik hastalıkların önlenmesine ve patojenik bakterilerin büyümesini engellemede katkı sağlamaktadırlar. Bu etkiyi biyolojik sistemlerde serbest radikal yayılımını durdurarak gösterirler.<sup>2</sup>

Bitkisel fenolikler primer antioksidant veya serbest radikal sonlandırıcı gibi davranan önemli bileşik gruplarından birini oluşturmaktadırlar. Flavonoidler en önemli fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler geniş kimyasal ve biyolojik aktivitelere sahiptir. Toplam fenolik bileşik içeriği ve toplam antioksidant kapasite arasındaki ilişkiyi incelemek önemlidir.<sup>3</sup> Bazı bilim adamları fenolik bileşenlerle antioksidant aktivitenin birbirine bağlı olduğunu ifade ederken, diğerleri böyle bir ilişki olmadığını savunmaktadırlar ve onlara göre diğer bileşikler radikal süpürme aktivitesinden sorumludur.<sup>3,4</sup>

Fenolikler açısından zengin olan meyve, sebze, tahıl, yemiş ve şifalı bitkilerin ham ekstraları gıda endüstrisinde önem taşımaktadır. Bitkisel materyallerin antioksidant bileşenlerinin sağlık halini devam ettirmedeki, koroner kalp hastalıkları

ve kanserden korumadaki önemleri bilim adamları, üreticiler ve tüketiciler arasında merak uyandırmıştır. Sebze ve meyvelerle zengin diyet ile günlük 1.0 g kadar polifenolik bileşik alınırsa insanlarda mutagenesis ve karsinogenesis üzerinde durdurucu etkisi olduğu belirtilmektedir.<sup>3</sup>

Sedir ve Köknar ham reçinelerinin, metanol ile hekzan ekstraktlarının ve bütün fraksiyonlarının (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5) 1 mg/mL'lik çözeltilerinin toplam fenolik bileşen miktar tayini yapıldı. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek (Şekil 4.7.1) toplam fenolik bileşen miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı (Çizelge 4.7.1).

Bu yöntemle göre Sedirin SFr2 ( $315.51 \pm 13.36 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine) fraksiyonunun en fazla ve Sedir (Heg) ( $49.13 \pm 2.85 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine) ekstraktının en az toplam fenolik bileşen içerdiği tespit edildi. Köknarın, Köknar (Ham) ( $56.52 \pm 4.60 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine) ekstraktının en fazla ve KFr5 ( $14.64 \pm 0.50 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine) fraksiyonunun en az toplam fenolik bileşen içerdiği tespit edildi. Ham Sedir reçinesinin toplam fenolik bileşen miktarı  $123.62 \pm 6.34 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine iken Ham Köknar reçinesinin ise  $56.52 \pm 4.60 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine olarak ölçüldü (Çizelge 4.7.1).

Ayrıca, Sedir (Ham) ( $123.62 \pm 6.34 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine), Sedir (MeOH) ( $216.67 \pm 7.56 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine), Sedir (Heg) ( $49.13 \pm 2.85 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine), SFr1 ( $186.81 \pm 6.03 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine) ve SFr2 ( $315.51 \pm 13.36 \mu\text{g GAE/mg}$  reçine)'nin toplam fenolik bileşen miktarları dikkat çekmektedir. Bunun nedeni;

kolon kromatografisinde kullanılan hareketli faz çözücü sistemlerinin polaritelerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Singh ve ark. (2007) *Acacia auriculiformis* A. Cunn. bitkisinin aseton fraksiyonlarının ve ham ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarını tayin etmişlerdir. Ham ekstraktta 300 mg GAE/g ekstrakt, etil asetat fraksiyonunda 495 mg GAE/g ekstrakt ve su fraksiyonunda 775 mg GAE/g ekstrakt tespit ettiklerini bildirmektedirler. Bu çalışmaya göre polifenolik bileşenler açısından zengin olan fraksiyonların ham ekstraktan daha etkili olduklarını saptamışlardır.<sup>5</sup>

Liu ve ark. (2007) *Ginkgo biloba* endofilik *Xylaria* sp. XY-28 meyvesinin antioksidant aktivitesini çeşitli çözücü sistemlerinde ölçmüşlerdir. Toplam fenolik bileşeni en fazla olan metanol ekstraktı ( $54.51 \pm 1.05$  mg GAE/g kuru ağırlık) ve en düşük olan hekzan ekstraktı ( $9.71 \pm 0.57$  mg GAE/g kuru ağırlık) olarak tespit etmişlerdir.<sup>6</sup>

Chua ve ark. (2008) tarafından *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. bitkisinin butanol fraksiyonunun toplam fenolik bileşen miktarına bakılmış ve 496.7 mg GAE/g olarak tespit ettiklerini bildirmektedirler.<sup>7</sup>

Bizim araştırmamızda toplam fenolik bileşen içeriğine yönelik elde ettiğimiz sonuçlar son iki referans ile uyum içerisindedir.

Sedir ve Köknar ham reçinelerinin, metanol ile hekzan ekstraktlarının ve bütün fraksiyonlarının (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4 ve SFr5 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5) 2 mg/mL'lik çözeltilerinin toplam flavonoid bileşen miktar tayini yapıldı. Standart flavonoid bileşik olarak quercetin kullanıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe



geçirilerek (Şekil 4.7.2) toplam flavonoid bileşen miktarı quercetin ekivalenti (QUE) olarak değerlendirildi (Çizelge 4.7.2).

Bu yönteme göre Sedir reçinesinin SFr5 ( $4.47 \pm 0.07 \mu\text{g QUE/mg reçine}$ ) fraksiyonunun en fazla ve Sedir (Heg) ( $0.17 \pm 0.02 \mu\text{g QUE/mg reçine}$ ) ekstraktının en az toplam flavonoid bileşen içerdiği tespit edildi. Köknar reçinesinin KFr5 ( $2.87 \pm 0.03 \mu\text{g QUE/mg reçine}$ ) fraksiyonunun en fazla ve Köknar (Heg) ( $0.38 \pm 0.41 \mu\text{g QUE/mg reçine}$ ) ekstraktının en az toplam flavonoid bileşen içerdiği tespit edildi. Ham Sedir reçinesinin toplam flavonoid bileşen miktarı ( $0.54 \pm 0.01 \mu\text{g QUE/mg reçine}$ ) iken Ham Köknar reçinesinin ( $0.41 \pm 0.02 \mu\text{g QUE/mg reçine}$ ) olarak ölçüldü (Çizelge 4.7.2).

Topçu ve ark. (2007) *Pistacia terebinthus* L. subsp. *terebinthus* L. meyvelerinden elde edilen aseton ve metanol ekstraktlarının toplam flavonoid bileşen miktarına bakmışlardır. Aseton ekstraktında ( $5.49 \pm 0.78 \mu\text{g QUE/mg ekstrakt}$ ) ve metanol ekstraktında ( $22.60 \pm 0.96 \mu\text{g QUE/mg ekstrakt}$ ) tespit ettiklerini bildirmektedirler.<sup>8</sup>

Yeşilyurt ve ark. (2008) *Salvia cedronelle* Boiss bitkisinin toprak üstündeki kısımlarının aseton ekstraktının toplam flavonoid bileşen miktarını araştırmışlardır. Ekstrakttaki toplam flavonoid bileşen miktarını ( $24.44 \pm 0.45 \mu\text{g QUE/mg ekstrakt}$ ) olarak bulduklarını bildirmektedirler.<sup>9</sup>

Kullandığımız materyallerin toplam flavonoid içeriği verilen referanslarla kıyaslanamayacak kadar düşüktür.

İndirgeme gücü antioksidant aktiviteyle ilgili önemli bir parametredir. İndirgen özellik gösteren fraksiyon ve/veya ekstraktlar hidrojen atomları vererek

serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarlar.<sup>5,10</sup> Bundan dolayı bir bileşiğin indirgeme kapasitesi potansiyel antioksidant aktivitesinin anlamlı indikatörü gibi düşünülebilir.<sup>10</sup>

3. 2. 2. 1. 2 'de belirtilen nedenden ötürü sadece Sedir metanol ekstraktı, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 fraksiyonları ile Köknar metanol ekstraktı ve KFr5 fraksiyonunun indirgeme gücü incelendi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu metotta test çözeltisinin sarı rengi test edilen numunenin indirgeme gücüne bağlı olarak yeşile dönüşür. Çözeltide bulunan indirgenler Fe<sup>+3</sup> (ferrisiyanür) kompleksini indirgeyerek ferröz Fe<sup>+2</sup> (ferröz) forma dönüştürürler. Bu indirgemeye bağlı olarak renk şiddetinde meydana gelen değişim 700 nm'de absorbans ölçülerek materyalin indiregeme gücü konusunda fikir edinilebilmektedir.<sup>7</sup>

Test numuneleri ve pozitif kontrol numuneleri varlığında incelenen Fe<sup>+3</sup>'ün Fe<sup>+2</sup>'ye indirgenmesi sonuçları Şekil 4.7.3 ve Çizelge 4.7.3'de verilmiştir. Bu verilerden test edilen reçinelerin (Sedir metanol ekstraktı, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5, Köknar metanol ekstraktı ve KFr5) ve pozitif kontrollerin (BHA, BHT) artan miktarlarına paralel olarak indirgeme güçlerinin de arttığı gözlenmektedir. SFr2'nin farklı konsantrasyonlarda etkili indirgeme gücü (p<0.05) gösterdiği izlendi. Reçineler ve pozitif kontrol numunelerinin 250 µg/mL derişimde gösterdiği indirgeme gücü sırasıyla; BHA>BHT> SFr2> Sedir (MeOH)> SFr3> SFr4=SFr5> Köknar (MeOH)>KFr5 olarak tespit edildi.

Singh ve ark. (2007) *Acacia auriculiformis* A. Cunn. bitkisinin aseton ekstrakt/fraksiyonlarının 150 µg/mL'deki en yüksek indirgeme gücünü 1.63 olarak bulmuşlardır.<sup>5</sup>

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) deneyi, bileşimin oynak H-atomlarını radikale transfer etme gücünü ölçen en yaygın antioksidant aktivite ölçme metodudur. DPPH kararlı serbest bir radikaldır ve bir elektron veya hidrojen kabul ederek kararlı diamagnetik molekül haline gelir. Sistein, glutatyon, askorbik asit, tokoferol, polihidroksi aromatik bileşikler (gallik asit, hidrokinon) hidrojen verme kapasiteleriyle 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazini indirgerler ve mor renk sarıya dönüşür.<sup>1,3,10</sup>

3. 2. 2. 1. 2 'de belirtilen nedenden ötürü sadece Sedir metanol ekstraktı, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 fraksiyonları ile Köknar metanol ekstraktı ve KFr5 fraksiyonunun DPPH radikalini söndürme aktivitesi test edildi. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen veriler Şekil 4.7.4 ve Çizelge 4.7.4'de verilmiştir. Reçine çözeltilerinin ve pozitif kontrol numunelerinin konsantrasyonu arttıkça radikal söndürme aktivitelerinin de arttığı gözlemlendi. Test edilen en yüksek derişim olan 150 µg/mL'de pozitif kontroller BHA % 95.34 ± 0.00 ve BHT % 92.51 ± 0.98 inhibisyon gösterdi. Sedir reçinesinin 150 µg/mL konsantrasyonda en yüksek aktivite gösteren fraksiyonunun % 92.10 ± 3.78 değeri ile SFr2 ve en düşük aktivite gösteren fraksiyonunun % 81.92 ± 0.24 değeri ile SFr5 oldukları saptandı. Aynı konsantrasyonda Köknar metanol ekstraktının ve KFr5'in sırasıyla % 16.67 ± 2.48 ve % 65.96 ± 2.69 inhibisyon değerleri gösterdiği bulundu. Reçine çözeltilerini pozitif kontrollerle karşılaştırdığımızda Sedir metanol ekstraktı ve test edilen fraksiyonları kayda değer aktiviteler göstermektedir. SFr2 BHT ile hemen hemen aynı inhibisyonu göstermektedir. Köknar metanol ekstraktının gösterdiği aktivite düşük olmasına rağmen, KFr5 önemli aktivite gösterdiği ancak BHT ve BHA ile karşılaştırılmayacak değerde olduğu saptandı.

Liu ve ark. (2007) *Ginkgo biloba* endofilik *Xylaria* sp. XY-28 meyvesinin metanol ekstraktının DPPH radikal söndürme aktivitesine bakmışlardır. BHT ve askorbik asit (Asc A) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 400 µg/mL derişimde sırasıyla; Asc A (% 90.16 ± 0.059), metanol ekstraktı (% 82.42 ± 0.04), BHT (% 60.24 ± 0.05) inhibisyon değerlerini elde ettiklerini ifade etmektedirler.<sup>6</sup>

Chua ve ark. (2008) *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. sürgünlerinin etanol ekstraktının n-Hekzan (Hex), etil asetat (EtOAc), n-butanol (BuOH) ve su fraksiyonunun DPPH radikalini söndürme aktivitesi tayinini yapmışlardır. 10 µg/mL konsantrasyonda inhibisyon değerlerini sırasıyla; quercetine (pozitif kontrol) (% 88.7) > BuOH (% 70.3) > ham ekstrakt (% 69.0) > EtOAc (% 54.4) > su (% 21.1) > Hex (% 16.8) olarak tespit ettiklerini belirtmektedirler.<sup>7</sup>

Yeşilyurt ve ark. (2008) *Salvia cedronelle* Boiss bitkisinin toprak üstündeki kısımlarının aseton ekstraktının DPPH radikal söndürme aktivitesine (%) bakmışlardır. BHT ve α-tokoferol pozitif kontrol olarak kullanılmış. 100 µg/mL derişimde elde edilen inhibisyon değerleri ekstrakt (% 95.39 ± 0.10), α-tokoferol (% 94.79 ± 0.50), BHT (% 94.42 ± 0.28) olarak tespit edilmiştir.<sup>9</sup>

Bu amaca yönelik elde ettiğimiz sonuçlar, Liu ve ark.'nın bulduğu sonuçlardan daha iyi, Chua ve ark.'nın bulduğu sonuçlardan kötü ve Yeşilyurt ve ark.'nın buldukları sonuçlarla yaklaşık aynı olduğu ifade edilebilmektedir.

Geçiş metalleri canlı organizmalarda serbest oksijen radikallerinin üretiminde önemli rol oynarlar. Demir yüksek etkinliğinden dolayı bu geçiş metallerinden en önemlisidir ve iki farklı oksidasyon formunda bulunmaktadır. Bu formlar; ferröz (Fe<sup>2+</sup>) iyon ve biyolojik olarak oldukça etkisiz olan ferrik (Fe<sup>3+</sup>) iyondur. Ferrik iyon

şartlara bağlı olarak  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenir ve ROS oluşturur. Bu şartlar özellikle pH, Fenton tipi reaksiyonlar ve Haber-Weiss zincir reaksiyonlarıdır. Demirin  $Fe^{2+}$  hali Fenton reaksiyonu aracılığıyla hidrojen ve lipid peroksitlerini reaktif serbest radikallere parçalayarak lipid oksidasyonunu hızlandırır. Aynı zamanda  $Fe^{3+}$  iyonu peroksitlerden radikal oluşturur, fakat bu tepkimenin gerçekleşme oranı  $Fe^{2+}$ 'den on kat daha düşüktür. Çeşitli metal iyonları arasında  $Fe^{2+}$  iyonu en güçlü pro-oksidanttır. Bu radikallerin oluşumu lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA hasarına yol açar. Metal şelatlayıcılar metal iyonlarını etkisizleştirirler ve metale bağlı süreçleri durdururlar. Demir şelatlama ajanlarının metale bağlı oksidatif süreçleri durdurması reaktif oksijen türlerine bağlı hastalıklarla mücadele etmek için önemlidir. ROS'nin üretimi Haber-Weiss reaksiyonu aracılığıyla serbest demir tarafından da katalizlenir.<sup>2,10,11</sup>

Bir metalle  $\sigma$ -bağı oluşturan şelatlama ajanları ikincil antioksidantlar gibi etkilidirler, çünkü bunlar redoks potansiyelini düşürerek demirin oksijen moleküllerine ulaşmasını engelleyebilir, böylece  $Fe^{2+}$  iyonu  $Fe^{3+}$  iyonuna dönüştürülür ve oksidatif hasar durdurulur. Ayrıca, flavonoid olmayan polifenoliklerin demiri indirgeyebildiği ve ardından inert olan  $Fe^{2+}$ -polifenol kompleksleri oluşturduğu bildirilmektedir.<sup>3,5</sup> Fenoliklerin metal şelatlama özellikleri genellikle UV-VIS absorpsiyon spektroskopisinde UV bantlarındaki kaymalar değerlendirilerek tespit edilir.<sup>10</sup>

Uygun konfigürasyonlarındaki  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ ,  $-PO_3H_2$ ,  $C=O$ ,  $-NR_2$ ,  $-S-$  ve  $-O-$  fonksiyonel gruplarından iki veya daha fazlasını bulunduran bileşiklerin metal şelatlama aktivitesi gösterebildiği bildirilmektedir.<sup>2</sup>

3. 2. 2. 1. 2 'de belirtilen nedenden ötürü sadece Sedir metanol ekstraktı, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 fraksiyonları ile Köknar metanol ekstraktı ve KFr5 fraksiyonunun metal şelatlama aktivitesi değerlendirildi. Literatürde pozitif kontrol olarak BHA ve BHT kullanıldığı belirtilmiş olmakla birlikte,<sup>4,5,12,13</sup> tarafımızdan önerilen metodlar kullanılarak defalarca yapılan testlerde olumlu sonuçlar elde edilemediğinden, pozitif kontrol olarak EDTA kullanıldı. Metal şelatlama aktivitesi Köknar metanol ekstraktı, KFr5, SFr4 ve SFr5 dışındaki test numunelerinde izlenemedi. Bu test örnekleri ve EDTA'nın 250 µg/mL derişimde gösterdiği metal şelatlama aktiviteleri sırayla EDTA (% 98.95 ± 0.03), KFr5 (% 63.06 ± 0.78), SFr5 (% 28.29 ± 1.69), Köknar (MeOH) (% 8.39 ± 0.17) ve SFr4 (% 6,53 ± 1.82) şeklinde izlendi (Şekil 4.7.5, Çizelge 4.7.5). Bu testte Köknar metanol ve KFr5, sedir fraksiyonlarından daha yüksek aktivite gösterdi. Ancak bunların gösterdiği aktivite değerleri de EDTA ile kıyaslanamaz değerdedir (p<0.05).

Kumaran ve Karunakaran (2007) *Phyllanthus* cinsinden beş bitkinin metanol ekstraktlarının metal şelatlama aktivitelerine bakmışlardır. Pozitif kontrol olarak BHT kullanmışlar. Elde ettikleri sonuçlar sırasıyla *P.debilis* (% 65.03) > *P. urinaria* (% 56.43) > *P. virgatus* (% 49.09) > BHT (% 48.21) > *P. maderaspatensis* (% 43.42) > *P. amarus* (% 35.62) olarak ifade edilmektedir.<sup>3</sup>

Yeşilyurt ve ark. (2008) *Salvia cedronelle* Boiss bitkisinin toprak üstündeki kısımlarının aseton ekstraktının metal şelatlama aktivitesine bakmışlardır. Quercetin ve (+)-catechine pozitif kontrol olarak kullanılmış. Bitki ve kontrol çözeltilerinin 400 µg/mL derişimde gösterdiği % metal şelatlama aktivitesi sırasıyla quercetin 14.37 ± 0.30, ekstrakt 6.07 ± 1.00 ve (+)-catechine 1.77 ± 0.70 olarak ifade edilmektedir.<sup>9</sup>

Türkiye dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerindendir. Bu durum, bitkisel ilaçların daha etkili, zehirli ve pahalı olan sentetik ilaçlarla bir arada kullanılmasına, tek başlarına ise alternatif tedavi ilacı olarak deri ve mukoza lezyonları ile diğer sistemlerin enfeksiyonlarında iyileştirici ve antiseptik olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu yönüyle antibakteriyel aktiviteye sahip bitkilerin bakteriyel kökenli insan, hayvan ve bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca baharat özelliğindeki bazı bitkilerin içerdikleri uçucu yağlar ile gıdaların kalitesinde düşüşe neden olmaksızın bakteriyel bozulmayı geciktirdikleri ve buna bağlı olarak koruyucu amaçla kullanıldıkları bildirilmektedir.<sup>14</sup> Sedir ve köknar reçineleri de bu amaçla kullanılmakta ve iyileştirici etkileri olduğu belirtilmektedir.

Sedir ve Köknar ham reçinelerinin, metanol ile hekzan ekstraktlarının ve bütün fraksiyonlarının (SFr1, SFr2, SFr3, SFr4, SFr5 ve SFr6 ile KFr1, KFr2, KFr3, KFr4 ve KFr5) antimikrobiyal aktiviteleri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pyogenes* standart bakteri suşları ile *Candida albicans* klinik izolatu ve İmipenem (IPM), Ofloksasin (OFX), Netilmisin (NET), Amoksisilin (AMC) ile Amfoterisin B standart antibiyotikleri kullanılarak test edildi. Çizelge 4.7.6 ve Çizelge 4.7.7’de reçinelerin ve standart antibiyotiklerin kullanılan mikroorganizmaların üremelerine karşı gösterdikleri engelleyici etkilerinin değerleri verilmektedir. Elde edilen bu verilere göre test edilen reçine ve reçine fraksiyonlarının gösterdiği engelleyici etkiler (8 ile 16 mm arası) kullanılan standart antibiyotiklerin gösterdiği engelleyici etkiler (20 ile >>30 mm arası) ile kıyaslanamayacak kadar düşüktür.

Kızıl ve ark. (2002) çalışmamızda kullandığımız ham reçinelerin etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini disk diffüzyon metodu kullanılarak test etmişler. Sonuç olarak; iki reçinenin ham ekstraktlarının mikroorganizmaların büyümesini engellemede yüksek etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.<sup>15</sup> Aynı sonuca kendi çalışmamızda ulaşamadık. Antimikrobiyal etkiyi bitkilerin uçucu yağ bileşenleri göstermektedir. 2000 yılında toplanan reçinelerin saklama koşulları ve zamana bağlı olarak uçucu bileşenlerinde meydana gelen kayba ve reçinelerin oksidasyona uğramalarına bağlı olarak bu sonuçların elde edilmiş olabileceği düşünüldü.

Elde edilen sonuçların ışığında, taze toplanmış aynı ya da farklı bitki reçinelerinin ayrıntılı fraksiyonlandırma ve saf bileşen elde etme çalışmaları ile araştırmanın amacına yönelik daha anlamlı sonuçlar elde edileceği tartışma götürmez. Dolayısıyla yeni materyallerle daha detaylı saflaştırma yöntemlerinin uygulandığı araştırmaların gerektiği kanısındayız.



## 5. 1. KAYNAKLAR

1. Ardestani, A.; Yazdanparast, R. *Food Chemistry*, **2007**, *104*, 21-29.
2. Gülçin, İ. *Life Sciences*, **2006**, *78*, 803–811.
3. Kumaran, A.; Karunakaran, R.J. *LWT*, **2007**, *40*, 344-352.
4. Oktay, M.; Gülçin, İ.; Küfrevioğlu, Ö.İ. *LWT*, **2003**, *36*, 263-271.
5. Singh, R.; Singh, S.; Kumar, S.; Arora, S. *Food chemistry*, **2007**, *103*, 1403-1410.
6. Liu, X.; Dong, M.; Chen, X.; Jiang, M.; Lv, X.; Yan, G. *Food Chemistry*, **2007**, *105*, 548-554.
7. Chua, M-T.; Tung, Y-Y.; Chang, S-T. *Bioresource Technology*, **2008**, *99*, 1918-1925.
8. Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarıkürkçü, C.; Öztürk, M.; Ulubelen, A. *Food Chemistry*, **2007**, *103*, 816-822.
9. Yeşilyurt, V.; Halfon, B.; Öztürk, M.; Topçu, G. *Food Chemistry*, **2008**, *108*, 31-39.
10. Habtemariam, S. *Food Chemistry*, **2007**, *102*, 1042–1047.
11. Gülçin, İ.; Elias, R.; Gepdiremen, A. *Eur Food Res. Technol.*, **2006**, *223*, 759-767.
12. Gülçin, İ.; Büyükokurpoğlu, M.E.; Okyay, M.; Küfrevioğlu, Ö.İ. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, *86*, 51-58.
13. Elmastaş, M.; Işıldak, Ö.; Türkekul, İ.; Temur, N. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2007**, *20*, 337-345.
14. Çelik, E.; Çelik, G.Y. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2007**, *2*, 1-6.
15. Kızıl, M.; Kızıl, G.; Yavuz, M.; AYTEKİN, Ç. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2002**, *38*, 144-146.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevcan ALTAŞ  
Doğum Yeri : Dicle / Diyarbakır  
Doğum Tarihi : 01.01.1978  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Cebeci Atatürk Anadolu Sağlık Meslek Lisesi / 1997  
Lisans : Dicle Üniv. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Böl. / 2005  
Yüksek Lisans : Dicle Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü / 2008

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Diyarbakır Sağlık Müdürlüğü – Hemşire / 07.01.1998-01.06.2007  
Mardin Sağlık Müdürlüğü – Kimyager / 01.06.2007-15.09.2008  
Diyarbakır Sağlık Müdürlüğü – Kimyager / 15.09.2008-