



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ISPIT'IN (*Trachystemon orientalis* (L.) G. Don)
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ

M. Mutluhan DÖĞER
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

Danışman
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Şubat, 2010

İSTANBUL



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ISPIT'IN (*Trachystemon orientalis* (L.) G. Don)
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ

M. Mutluhan DÖĞER
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

Danışman
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Şubat, 2010

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans ve Doktora öğrenimim sırasında yardımlarını esirgemeyen ve tez çalışmalarım boyunca değerli fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, her aşamada yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Özlem SAÇAN'a, çalışmalarım esnasında yardımlarını aldığım ve her zaman desteklerini hissettiğim Sayın Yard. Doç. Dr. Sevim TUNALI'ya, Ar. Gör. Bertan B. BAYRAK'a ve Ar. Gör. İ. Burcu TÜRKYILMAZ'a teşekkür ederim.

Doktora tez izleme komitesi üyeleri, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Nuriye Akev ve Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ayşen Yarat'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca bana her zaman sonsuz destek olan aileme ve doktora öğrenimim süresince desteğini esirgemeyen eşime çok teşekkür ederim.

İspıt bitkisinin teşhisini yapan Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı emekli Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Kerim ALPINAR'a da teşekkür ederim.

Şubat, 2010

M. Mutluhan DÖĞER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
DENKLEM LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
1.GİRİŞ.....	13
2.GENEL KISIMLAR.....	15
2.1. SERBEST RADİKALLER.....	15
2.1.1. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları	16
2.2.1.1. <i>Elektron Transferi</i>	<i>16</i>
2.2.1.2. <i>Homolitik Parçalanma</i>	<i>16</i>
2.2.1.3. <i>Heterolitik Parçalanma.....</i>	<i>17</i>
2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	17
2.1.2.1. <i>Endojen Kaynaklar.....</i>	<i>18</i>
2.1.2.2. <i>Eksojen Kaynaklar</i>	<i>21</i>
2.2. SERBEST RADİKAL TÜRLERİ.....	21
2.1.3. Reaktif Oksijen Türleri	23
2.1.3.1. <i>Süperoksid Radikali</i>	<i>24</i>
2.1.3.2. <i>Hidroksi Radikali</i>	<i>25</i>
2.1.3.3. <i>Hidrojen Peroksid</i>	<i>25</i>
2.1.3.4. <i>Singlet Oksijen</i>	<i>27</i>
2.1.3.5. <i>Peroksil ve Alkoksil Radikalleri</i>	<i>27</i>

2.1.3.6. Ozon (O ₃)	28
2.2.2. Reaktif Azot Türleri.....	28
2.2.2.1. Nitrik oksid (NO) ve Nitrik dioksid (NO ₂)	28
2.2.2.2. Peroksinitrit	29
2.3. OKSİDATİF STRES.....	29
2.3.1. Lipid Peroksidasyonu.....	30
2.3.2. Protein Oksidasyonu.....	32
2.3.3. DNA Hasarı	32
2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ VE ANTİOKSİDANLAR.....	34
2.4.1. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar	35
2.4.2. Enzimatik Savunma	37
2.4.2.1. Süperoksid Dismutaz	37
2.4.2.2. Katalaz	38
2.4.2.3. Glutatyon Peroksidaz	38
2.4.2.4. Glutatyon-S-Transferaz	39
2.4.2.5. Glutatyon Redüktaz	39
2.4.3. Non Enzimatik Antioksidan Savunma.....	39
2.4.3.1. Tokoferoller ve Tokotrienoller	39
2.4.3.2. Askorbik Asid	41
2.4.3.3. Karotenoidler	42
2.4.3.4. Polifenoller.....	43
2.4.3.5. Flavonoidler.....	45
2.4.3.6. Glutatyon.....	48
2.4.3.7. Albumin	48
2.4.3.8. Bilirubin	48
2.4.3.9. Ürik Asid	48
2.4.3.10. Selenyum	48
2.4.3.11. Lipoik Asid	48
2.4.4. Sentetik Antioksidanlar	49
2.4.4.1. Butillenmiş Hidroksianizol.....	49
2.4.4.2. Butillenmiş Hidroksitoluen	50
2.4.4.3. Tersiyer Butil Hidrokinon	51
2.4.4.4. Propil Gallat	51

2.4.4.5. Nordihidroguayeretik Asid.....	52
2.5. ISPIT	53
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	60
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER.....	60
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	61
3.3. BİTKİ MATERYALİ	63
3.3.1. Sulu Ekstrenin Hazırlanması.....	64
3.3.2. Etil Alkollü Ekstrenin Hazırlanması.....	64
3.3.3. Etil Asetatlı Ekstrenin Hazırlanması	64
3.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE DENEYLERİ	65
3.4.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini.....	65
3.4.2. Total Flavonoid Miktar Tayini	66
3.4.3. Prolin Miktar Tayini.....	66
3.4.4. E Vitamini Miktar Tayini.....	67
3.4.5. İndirgeme Gücü.....	67
3.4.6. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi.....	68
3.4.7. Hidroksi Radikal Giderme Aktivitesi	70
3.4.8. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi	71
3.4.9. DMPD Radikal Giderme Aktivitesi.....	72
3.4.10. Metal Kelatlama Aktivitesi	73
3.4.11. H ₂ O ₂ Radikal Giderme Aktivite Tayini	74
3.4.12. Demir (III) – Askorbik Asid ile İndüklenmiş Fosfatidilkolin Lipozomlarının Peroksidasyonu Aktivitesi	74
3.4.13. Demir İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi....	75
4. BULGULAR.....	77
4.1. TOTAL FENOLİK BİLEŞİK MİKTARI TAYİNİ.....	78
4.2. TOTAL FLAVONOİD MİKTAR TAYİNİ	79
4.3. PROLİN TAYİNİ.....	80
4.4. E VİTAMİNİ MİKTAR TAYİNİ.....	81
4.5. İNDİRGEME GÜCÜ.....	81
4.6. DPPH RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ.....	82

4.7. HİDROKSİ RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ.....	87
4.8. ABTS RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ.....	88
4.9. DMPD RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ.....	89
4.10. METAL KELATLAMA AKTİVİTESİ.....	91
4.11. H ₂ O ₂ RADİKAL GİDERME AKTİVİTE TAYİNİ	96
4.12. DEMİR (III) – ASKORBİK ASİD İLE İNDÜKLENMİŞ FOSFATİDİLKOLİN LİPOZOMLARININ PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ANTIOKSİDAN ETKİSİ... ..	98
4.13. FERRİ İYONU REDÜKLEYİCİ ANTIOKSİDAN POTANSİYELİ (FRAP) DENEYİ.....	99
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	101
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	125

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Singlet oksijenin delta ve sigma formları	27
Şekil 2.2	: Lipid peroksidasyonu	31
Şekil 2.3	: α -Tokoferolün genel yapısı.....	40
Şekil 2.4	: C vitamininin kimyasal yapısı	41
Şekil 2.5	: β -Karoten, Likopen, Lutein ve Zeaksantin'in kimyasal yapısı.....	43
Şekil 2.6	: Flavonoidlerin kimyasal yapıları	45
Şekil 2.7	: Apigenin ve luteolinin kimyasal yapısı	46
Şekil 2.8	: Kuersetin ve kamferolün kimyasal yapısı.....	46
Şekil 2.9	: Daidzein ve genisteinin kimyasal yapısı.....	46
Şekil 2.10	: Hesperidinin kimyasal yapısı.....	47
Şekil 2.11	: Apigenidinin ve siyanidinin kimyasal yapısı.....	47
Şekil 2.12	: BHA'nın kimyasal yapısı	50
Şekil 2.13	: BHT'nin kimyasal yapısı.....	50
Şekil 2.14	: TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	51
Şekil 2.15	: Propil gallatın kimyasal yapısı.....	52
Şekil 2.16	: NDGA'nın kimyasal yapısı	52
Şekil 2.17	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	54
Şekil 2.18	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	55
Şekil 2.19	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	55
Şekil 2.20	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	56
Şekil 2.21	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	56
Şekil 2.22	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	57
Şekil 2.23	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	58
Şekil 2.24	: Ispıtın çeşitli görünüşleri.....	59
Şekil 3.1	: Pirokateşolün kimyasal yapısı	65
Şekil 3.2	: Kateşinin kimyasal yapısı.....	66
Şekil 3.3	: Prolinin kimyasal yapısı	67
Şekil 3.4	: DPPH radikalinin indirgenmesi.....	68
Şekil 3.5	: BHA molekülünün kimyasal yapısı.....	69
Şekil 3.6	: Troloksun kimyasal yapısı.....	69
Şekil 3.7	: Askorbik asidin kimyasal yapısı.....	69
Şekil 3.8	: Rutinin kimyasal yapısı	70
Şekil 3.9	: Kuersetinin kimyasal yapısı.....	70
Şekil 3.10	: α -Tokoferolün kimyasal yapısı.....	71
Şekil 3.11	: 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid) amonyum tuzunun persülfatla oksidasyonu sonucu ABTS ^{•+} meydana gelişi.....	72
Şekil 3.12	: Fe (III) tuzlarının [Fe (III) (TPTZ) ₂] ³⁺ , Fe (II)'ye [Fe (II) (TPTZ) ₂] ²⁺ indirgenmesi.....	76
Şekil 4.1	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstreleri için UV-görünür spektrumları.....	78
Şekil 4.2	: Ispıtın sulu ekstrelerinin ve α -Tokoferol asetatın (E vitamini) indirgeme güçleri.....	82
Şekil 4.3	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 5. dakikadaki % DPPH radikalı giderme aktiviteleri.....	84
Şekil 4.4	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 10. dakikadaki % DPPH radikalı giderme aktiviteleri.....	85
Şekil 4.5	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 30. dakikadaki % DPPH radikalı giderme aktiviteleri.....	86
Şekil 4.6	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 60. dakikadaki % DPPH radikalı giderme aktiviteleri.....	87
Şekil 4.7	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve askorbik asid, BHA ve α -tokoferolün % hidroksi radikalı giderme aktiviteleri.....	88
Şekil 4.8	: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve Troloks, kuersetin ve rutinin %	

ABTS radikali giderme aktiviteleri	89
Şekil 4.9 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve askorbik asid, BHA ve Troloksun % DMPD radikali giderme aktiviteleri	91
Şekil 4.10 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, Troloks ve α -tokoferolün 5. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri	92
Şekil 4.11 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, Troloks ve α -tokoferolün 10. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri	93
Şekil 4.12 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, Troloks ve α -tokoferolün 30. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri	94
Şekil 4.13 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, Troloks ve α -tokoferolün 60. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri	95
Şekil 4.14 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, Troloks ve α -tokoferolün 10 μ g/mL derişimdeki % metal kelatlama aktiviteleri	96
Şekil 4.15 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, α -tokoferol ve Troloks standartlarının % H ₂ O ₂ radikal giderme aktiviteleri	97
Şekil 4.16 : Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve α -tokoferol standartının % fosfatidilkolin lipozomlarının peroksidasyonu inhibisyonu	99

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. : Serbest radikal kaynakları	18
Tablo 2.2. : Serbest radikal türleri ile radikal özellik gösteren bazı metabolitler	22
Tablo 2.3. : Serbest radikallerin neden olduğu bazı hastalıklar	23
Tablo 2.4. : Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar	36
Tablo 2.5. : Fenolik bileşenlerin sınıfları.....	44
Tablo 4.1. : Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarlarının pirokateşol ekivalenti olarak değerlendirilmesi ($\mu\text{g/mL}$)	79
Tablo 4.2. : Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin flavonoid miktarlarının kateşin ekivalenti olarak değerlendirilmesi ($\mu\text{g/mL}$).....	80
Tablo 4.3. : Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin prolin miktarlarının prolin ekivalenti olarak değerlendirilmesi ($\mu\text{g/mL}$)	80
Tablo 4.4. : Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin E vitamini miktarlarının α -tokoferol ekivalenti olarak değerlendirilmesi (mg/mL)	81
Tablo 4.5. : Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin FRAP değerlerinin miktarlarının Fe^{3+} 'nın Fe^{2+} 'ya indirgenmesi olarak değerlendirilmesi (mM/L).....	100

DENKLEM LİSTESİ

Denklem 2.1 : Elektron transferi	16
Denklem 2.2 : Homolitik parçalanma	16
Denklem 2.3 : Heterolitik parçalanma	17
Denklem 2.4 : Oksijenin elektron alarak süperoksidin radikali oluşumu	24
Denklem 2.5 : Süperoksid radikalının nitrik oksitle reaksiyona girerek peroksinitrit radikalının oluşumu	24
Denklem 2.6 : Hidrojen peroksitten hidroksi radikalının oluşumu	24
Denklem 2.7 : Hidrojen peroksitten hidroksi radikalının oluşumu	25
Denklem 2.8 : Haber-Weiss reaksiyonu	25
Denklem 2.9 : Oksijen ve Süperoksid radikalından Hidrojen peroksid oluşumu	25
Denklem 2.10 : Süperoksid radikalından hidrojen peroksid oluşumu	26
Denklem 2.11 : Süperoksid radikali ve hidrojen peroksitten hidroksi radikali oluşumu	26
Denklem 2.12 : Alkoksil ve Peroksil radikali oluşumu	27
Denklem 2.13 : L-Argininden nitrik oksid oluşumu	29
Denklem 2.14 : Süperoksid ve nitrik oksid radikallerinin peroksinitrit radikali oluşumu	29
Denklem 2.15 : Peroksinitrit radikalının Hidrojen alarak hidroksi ve azot dioksit radikali oluşumu	29
Denklem 2.16 : Süperoksid serbest radikalını hidrojen perokside dönüşümü	37
Denklem 2.17 : Hidrojen peroksitten katalaz ile su oluşumu	38
Denklem 2.18 : Hidroperoksidlerin glutatyon ile indirgenmesi	38
Denklem 2.19 : Peroksil radikallerinin C vitamini ile indirgenmesi	41
Denklem 3.1 : DMPD radikali giderilmesi	72

SEMBOL LİSTESİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid)
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
CCl₃[•]	: Triklormetil radikali
CCl₄	: Karbon tetra klorür
CCl₃O₂[•]	: Peroksil radikali
CoA	: Koenzim A
DCIP	: Diklorindofenol
DCIPH₂	: İndirgenmiş diklorindofenol
DMPD	: N,N-Dimetil-1,4-fenilen diamonyum diklorid
DNA	: Deoksiribonükleik asid
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asid
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FRAP	: Demir iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli
GP_x	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
GSH	: Glutasyon
GSSH	: İndirgenmiş glutasyon
Hem	: Hem grubu
HNE	: 4-Hidroksi-2-nonenal
MDA	: Malondialdehit
NAD[•]	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH+H⁺	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NDGA	: Nordihidroguareyetik asid
NOS	: Nitrik oksid sentaz
PG	: Propil gallat
P450	: Sitokrom p450 enzim sistemi
RNA	: Ribonükleik asid
RNT	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksid dismutaz
TBARS	: Tiyobarbitürik asid reaktif türleri
TBA	: Tiyobarbitürik asid
TCA	: Triklor asetik asid
TBHQ	: Tersiyerbütül hidrokinon
TPTZ	: 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazin
Troloks	: 6- Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasid
UV	: Ultraviyole

ÖZET

İSPİT'İN (*Trachystemon orientalis* (L.) G. Don)'IN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ

İspit (*Trachystemon orientalis* (L.) G. Don), Türkiye'de Marmara ve Karadeniz bölgesinde yetişir ve bu bölgelerde sebze olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Literatürde, ıspıtın balgam söktürücü, terletici, idrar söktürücü ve ateş düşürücü etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. İspıtın bu etkilerinin antioksidan aktiviteden ileri gelebileceği düşünülebilir.

Bu çalışmada, ıspıttan hazırlanan sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstrelerin antioksidan aktiviteleri; DPPH radikal giderme aktivitesi, hidroksi radikal giderme aktivitesi, ABTS radikal giderme aktivitesi, DMPD radikal giderme aktivitesi, metal kelatlama aktivitesi, hidrojen peroksid radikal giderme aktivitesi ve lipozom peroksidasyonu üzerine antioksidan aktivitesi ve ferri iyonu üzerine redükleyici antioksidan potansiyeli gibi çeşitli antioksidan testler kullanılarak incelendi. Sonuçlar butillenmiş hidroksianisol, butillenmiş hidroksitoluen, Troloks, vitamin E gibi sentetik antioksidanlarda karşılaştırıldı. Ekstrelerin total fenolik bileşikleri, flavonoid miktarları, prolin miktarları ve E vitamini miktarları da tayin edildi. Ekstrelerin bütün testlerde antioksidan aktivite gösterdiği ve bu ekstrelerin doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği sonucuna varıldı.

SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITY of *Trachystemon orientalis* (L.) G. DON

Trachystemon orientalis (L.) G. Don is grown in Marmara and Black Sea regions of Turkey and is commonly used as a vegetable in these regions. In literature, it is pointed out that *orientalis* has expectorant, diaphoretic, diuretic and antipyretic effects. It can be thought that these effects of *Trachystemon orientalis* (L.) G. Don arise from its antioxidant activity.

In this study, some tests are evaluated of water, ethanol and ethyl acetate extracts of *Trachystemon orientalis* to find out antioxidant activity depends at different maturing stages of plant or not. These tests are; DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, ABTS radical scavenging, DMPD radical scavenging, metal chelating activity, hydrogen peroxide radical scavenging, antioxidant activity on liposome peroxidation, ferric ion reducing antioxidant power assay were employed in order to evaluate the antioxidant activities of water, ethanol and ethyl acetate extracts of *Trachystemon orientalis* (L.) G. Don. The results were compared with synthetic antioxidants, e. g. butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, Trolox, and vitamin E. The levels of total phenolic compounds, total flavonoids, proline and vitamin E of the extracts were also determined. It was determined that extracts have shown antioxidant activity in all tests and that they could be considered as a source of natural antioxidants.

1. GİRİŞ

Aerobik organizmalarda oksijen, canlılığın devamı için temel koşuldur. Ancak canlı için hayati önemde olan oksijenin bir kısmı serbest oksijen radikali oluşumunda rol alır. Günümüzde çalışmalar hücre hasarına neden olan etkenler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Serbest radikaller bir dizi enzimatik ve nonenzimatik reaksiyonlar ile aktif radikallere dönüşebilirler. Oksijen-antioksidan dengesinin aktif oksijen yönünde bozulması hücre içinde radikal artışına dolayısı ile kalp hastalıkları, astım, kanser, genetik hastalıklar, şeker gibi hastalıklara, doku hasarına ve organ fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir [1].

Lipid peroksidasyonu (LPO), membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile gelişen zincirleme bir reaksiyon dizisidir. Reaksiyon yıkım ürünleri olan aldehitler organizma için önem taşımaktadır [1]. Bu yıkım ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyon derecesini belirlemek için uygun bir indekstir [2]. Oluşan bu ürünler DNA sentezini inhibe eder, proteinlerde çapraz bağlanmalar yapar ve DNA replikasyonunu önleyerek hücre membranının akışkanlığını azaltır ve hücre fonksiyonları bozar [1].

Antioksidanlar, serbest radikalleri bertaraf ederek bu hastalıkların oluşumunu önler. Antioksidan etkileri fazla olan bileşikler; C ve E vitaminleri, tanenler, flavonoidler, glutatyon peroksidaz, glutatyon, katalaz gibi enzimlerdir. Karotenoidler ve selenyum gibi eser elementlerdir. Sentetik antioksidan olarak butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT) gibi maddeler kullanılmaktadır. Dışarıdan verilen antioksidanlar serbest radikal hasarına karşı korunmada büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda sentetik oksidanların vücut için toksik etkilerinin bulunması ile birlikte doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır. Antioksidanlar vücutta üretildikleri gibi, dışarıdan gıda yolu ile de alınabilmektedir. Besin faktörlerinde bulunan antioksidanlar insan sağlığına faydalı oldukları gibi gıda maddelerinin de raf ömrünü uzatarak ve

oksidasyonu geciktirerek veya inhibe ederek besin değerlerindeki kaybı azaltmaktadırlar. Antioksidan madde içeren gıda maddelerinin tüketimi sonucunda kanser, kalp ve damar hastalıklarının oranında büyük ölçüde azalma görüldüğü saptanmıştır. Bu amaçla, birçok bitkinin antioksidan aktivitesinin olup olmadığı incelenmektedir.

Bu tez çalışmasında Kuzey Anadolu Bölgesi'nde fazla miktarda yetişen ısıpıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının antioksidan etkisinin olup olmadığı sentetik antioksiadanlarla karşılaştırılarak, çeşitli antioksidan testler uygulanarak incelenmiştir. Buna göre bitkinin antioksidan kaynağı olup olamayacağı saptanması amaçlanmıştır.

..

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADİKALLER

Atom, nötron ve protonlardan oluşan bir çekirdek ile bu çekirdeğin etrafında dönen elektronlardan meydana gelir. Atomlardaki elektronlar, orbital olarak bilinen belirli enerji seviyelerinde bulunurlar. Her bir orbital, zıt spinli en çok iki elektron tutabilir. Bu şekilde stabil olan atomlar, stabilitelerini koruyabilmek ya da daha stabil hale gelmek için yörüngelerindeki elektron sayılarını tamamlarlar. Serbest radikaller dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom, iyon veya moleküller olarak tanımlanabilirler [3]. Serbest radikalın eşleşmemiş elektronu bulunduğu atom veya grubun üzerinde ya da yanında bir nokta (.) ile gösterilir [4-6]. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için radikallerin reaktivitesi çok yüksektir [7]. Serbest radikaller, kısa ömürlüdürler ve elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler [8-11]. Serbest radikaller kimyasal olarak kararsız yapıdadırlar ve stabil hale geçebilmek için eşleşmemiş elektronlarını paylaşmak üzere diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler. Serbest radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme devam eder. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir [8]. Oksijenin önemi genel olarak serbest oksijen radikalleri, kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasının ortak elektronlardan birini alarak bölünmesi, elektron eklenmesi ya da elektron kaybolması ile meydana gelirken, biyolojik sistemlerde daha çok elektron transferi sonucu oluşur [12]. Oksijen kullanan her organizmada, gerçekleşen reaksiyonların bir sonucu olarak serbest radikaller üretilmektedir. Hem oksijen kaynaklı serbest radikaller (ROT) hem de azot kaynaklı serbest radikaller (RAT), biyolojik sistemlerde çift taraflı etkilidir, yani hem yararlı etkileri hem de zararlı etkileri vardır. Serbest radikaller, yüksek konsantrasyonlarda oluştuğları takdirde, membran lipidleri, protein ve nükleik asitlerin yıkımına yol açabilecek şekilde zararlı

olabilmektedirler. Bu etkileri de antioksidan enzimlere ek olarak non-enzimatik antioksidan sistemler sayesinde dengelenmektedir [13, 14].

Oksijenin radyasyona maruz bırakılan hayvan ve bakteri hücre kültürlerindeki radyasyon hasarını arttırdığı saptanmıştır [15]. Moleküler oksijenin oksidasyon yeteneği nispeten az olmasına rağmen süperoksid ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türlerinin aktivitesi çok daha yüksektir. Yüksek radikal konsantrasyonunda, bu reaktif türlerini uzaklaştıracak antioksidan sistemleri yetersiz kalmakta ve özellikle doymamış yağ asitleri oksidasyona uğramaktadır. Dolayısıyla yüksek lipid içeriğine sahip olan sinir ve membran dokuları yüksek oksijen konsantrasyonunda kolayca oksidatif hasara uğramaktadır [16]. Dengenin serbest radikaller lehine bozulmasına oksidatif stres denilmektedir.

2.1.1. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

Serbest radikaller 3 yolla oluşurlar [17, 18]:

2.1.1.1. Elektron Transferi

Radikal özelliği bulunmayan bir moleküle 1 elektron eklenmesi veya molekülden bir elektron çıkarılması ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron bulunması sonucu serbest radikal meydana gelir.



2.1.1.2. Homolitik Parçalanma

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600°C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında kovalent bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa homolitik yıkım meydana gelir.



2.1.1.3. Heterolitik Parçalanma

Radikal olmayan bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi sonucunda kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birinde kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.



2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları

Moleküler oksijen elektron konfigürasyonu dolayısıyla reaktif değildir. Oksijen elektron vererek veya enerjiyle aktive olur. Ancak oksijen molekülüne enerji ya da elektron sağlanmasından sonra bu sınırlama ortadan kalkar ve reaktif türlerin oluşması kendiliğinden gerçekleşir. Geçiş metal iyonları (Fe^{2+} , Cu^{2+}) gibi \bar{e} donörleri ile bu reaksiyonlar gerçekleşir. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu enzimatik ve nonenzimatik olabilir.

ROT'lar, aynı zamanda kloroplastlarda, mitokondride ve plazma membranındaki elektron transport zincirinde yan ürünler olarak da meydana gelebilirler [19].

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyonla adenzintrifosfat (ATP) üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken birtakım tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Serbest radikal kaynakları biyolojik, hücre içi sıvısı veya toksik maddeler olabilir. Bu kaynaklar endojen ve eksojen olmak üzere iki genel başlık altında sınıflandırılabilir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Serbest Radikal Kaynakları

ENDOJEN KAYNAKLAR	EKSOJEN KAYNAKLAR
Mitokondriyal e ⁻ transport zinciri	Çözücüler
Mikrozomal e ⁻ transport zinciri	Anestezikler
Kloroplast e ⁻ transport zinciri	İlaçlar
Oksidan enzimler	İyonize radyasyon
Proteinler	X-Işını
Araşidonik asid döngüsünün aktivasyonu	Güneş ışığı (UV)
Oksidatif stres	Isı şoku
Peroksizomlar	Ozon
Plazma membranı	Sigara dumanı
Transizyon metalleri	Kirleticiler
Fagositik hücreler	Egsoz gazları
Endojenik bileşiklerin otooksidasyon reaksiyonları	Glutatyonu okside eden maddeler - Asetaminofen -kokain
Egzersiz	Metal iyonları

2.1.2.1. Endojen Kaynaklar

- *Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri*

Mitokondri, hücre solunumunun gerçekleştiği organeldir. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijenin % 95'i suya indirgenirken %1-5 kadarı süperoksit yapımında kullanılır. Bunun nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır [18, 20].

- *Mikrozomal Elektron Transport Zinciri*

Endoplazmik retikulumda ve nükleer membranlarda birçok P450 ve flavin mono oksijenaz (FMO) enzim sistemleri bulunur. Bu enzim sistemleri doymamış yağ asitlerini ve organizma için yabancı olan maddeleri okside ederek serbest radikal oluştururlar [21].

- *Proteinler*

Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arginin, glisin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinden veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda protein karbonil türevleri oluşur. Ayrıca serbest radikaller proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olurlar [22].

- *Araşidonik Asit Döngüsünün Aktivasyonu*

Araşidonik asit döngüsü reaktif oksijen türlerinin üretildiği önemli bir kavşaktır. Fagositik hücrelerin uyarılması ile fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asit salınımına neden olur. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile serbest radikal ürünler açığa çıkar [23].

- *Oksidatif Stres Yapıcı Durumlar (Travma, İskemi, Reperfüzyon)*

Metabolizmada her an serbest radikal üretimi vardır. Ancak üretilen bu serbest radikaller endojen ve eksojen antioksidan sistemler tarafından elimine edilir ve bir denge oluşur. Eğer denge serbest radikaller lehine bozulacak olursa buna oksidatif stres adı verilir. Travma, çoğu zaman kinetik, termal veya kimyasal enerjinin dokulara transferi ile yapısal hasar oluşturmasından kaynaklanır. Normal homeostatik mekanizmaların kaybına, fizyolojik gereksinimlerin artmasına ve anormalleşmesine neden olur.

- *Fagositik Hücreler*

Fagositik hücreler, enfeksiyona karşı vücudun hücresel cevabını başlatan hücrelerdir. Bu hücreler: nötrofiller, monositler ve makrofajlar, eozinofiller, lenfositler, endotelial hücrelerdir. Fagositik hücreler, fagositoz sırasında bakterileri öldürmek için hidrojen peroksid veya hipokloröz asit meydana getirirler. Bu işlemleri önemli iki tür mekanizma ile gerçekleştirirler [24]:

MPO (miyeloperoksidaz) sistemi

NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz sistemi

- *Peroksizomlar*

Oksidazların yüksek derişimlerde bulunmalarından dolayı hüresel hidrojen peroksid kaynağıdır. Bu yapılar; D-amino asid oksidaz, ürat oksidaz, L-alfa-hidroksi asid oksidaz ve açıl CoA (koenzim A) oksidaz olup, bunlardan oldukça fazla miktarda bulunurlar [25].

- *Plazma Membranı*

İntrasellüler olarak ortaya çıkan serbest radikaller, hücrenin diğer bölümleriyle reaksiyona girebilmek için ya plazma membranını geçmek durumundadırlar ya da toksik reaksiyonları membranda başlatmalıdırlar. Membran yapısında bulunan doymamış yağ asidleri, fosfolipidler, glikolipidler, gliserol ve steroller, okside olabilen amino asid içeren membran proteinleri, serbest radikal hasarına karşı duyarlıdırlar. Serbest radikaller tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu veya yapı proteinlerinin oksidasyonu, membran iyon geçirgenliğinin bozulmasına, sekresyon fonksiyonlarında kayıplara ve hücre içi metabolik olayların inhibisyonuna neden olabilir.

Plazma membranında bulunan lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde bulunan NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonuna sebep olan serbest radikallerin kaynaklarıdır. Fagositoz esnasında, oksijen tüketimi artışı ile oksijenden süperoksid dolayısıyla hidrojen peroksid açığa çıkışı da artar. Bu nedenle fagositik hücrelerin plazma membranları NADPH oksidazın aracılık ettiği serbest radikal üretiminde önemli bir kaynaktır. Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membranına bağlı olan enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asidin biyolojik olarak etkili ürünlere (prostaglandinler, lökotrienler, tromboksanlar) dönüşümü sırasında serbest radikaller meydana gelir [23].

- *Tranzisyon Metalleri*

Bakır ve demir gibi geçiş metalleri oksido-redüksiyon reaksiyonlarında rol alırlar. DNA (Deoksiribonükleik asid), protein ve lipidlere elektron taşıyarak oksidatif hasarı

hızlandırırlar. Hücre lizisi sonucu hücre içinde ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanan demir ile yapısında bakır bulunan seruloplazmin proteinlerinin yıkımıyla demir ve bakır serbest hale geçer. Bunun sonucunda çevre dokulara salınan Fe ve Cu katalizör işlevi görerek oksidatif hasarı arttırır [21]. Metal iyonları aynı zamanda lipid peroksidlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize eder. Böylece radikal zararını arttırır.

2.1.2.2. Eksojen Kaynaklar

- *İlaçlar*

Herbisitler, pestisitler, parasetamol, aminotriazol, asetaminofen, bleomisin, doksorubisin, hiperbarik oksijen, klonazin, klosapin, 3,4- metilendioksümetamfetamin, nitrofurantoin, siprofloksasin, siklosporin, trisiklik antidepressanlar ve troglitazon serbest radikal oluşumuna yol açan ilaçlardır [26].

- *Metal İyonları*

Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa iyonları serbest radikal oluşumuna neden olurlar [26].

- *Kirleticiler*

Asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbonmonoksit, nitrik oksid, azot dioksit, silika, bazı çözücüler, toksinler, hipoklorid, kükürt dioksit, parakuat, dikuat, plumbagin, juglone gibi kirleticiler serbest radikal kaynaklarındandır [26].

- *Radyasyon*

Ultraviyole ışık, x ışını, gamma ışını da radikal oluşumuna neden olurlar [26].

2.2.SERBEST RADİKAL TÜRLERİ

Serbest radikal türleri ile radikal özelliği gösteren bazı metabolitler Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Serbest radikal türleri ile radikal özellik gösteren bazı metabolitler

Serbest Radikaller	Radikal Olmayan Reaktif Türleri
Reaktif Oksijen Türleri	Reaktif Oksijen Türleri
Singlet Oksijen (O_2^1)	Ozon (O_3)
Süperoksid Radikali ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen Peroksid (H_2O_2)
Hidroksi Radikali (HO^{\bullet})	Organik Peroksidler ($ROOH$)
Alkoksil Radikali ($R O^{\bullet}$)	Peroksinitrit Radikali ($ONOO^{\bullet}$)
Peroksil Radikali (ROO^{\bullet})	Peroksinitrik asid ($ONOOH$)
Hidroperoksil Radikali (HO_2^{\bullet})	Peroksonitrat (O_2NOO^{\bullet})
Karbonat Radikali ($CO_3^{\bullet-}$)	Peroksomono karbonat ($HOOCO_2^{\bullet-}$)
Karbondioksit Radikali ($CO_2^{\bullet-}$)	Hipobromik asid ($HOBr$)
	Hipoklorik asid ($HOCl$)
Reaktif Klorür Türleri	Reaktif Klorür Türleri
Klor radikali (Cl^{\bullet})	Hipoklorik Asid ($HOCl$) Klor gazı (Cl_2)
	Nitril klorit (NO_2Cl) Brom klorür ($BrCl$)
	Kloraminler Klordioksit (ClO_2)
Reaktif Brom Türleri	Reaktif Brom Türleri
Brom radikali (Br^{\bullet})	Hipobromik Asid ($HOBr$)
	Brom gazı (Br_2)
	Brom klorür ($BrCl$)
Reaktif Azot Türleri	Reaktif Azot Türleri
Azot Dioksit (NO_2^{\bullet})	Nitrik asid (HNO_3) Peroksinitrat ($OONOO^{\bullet}$)
Nitrat Radikali (NO_3^{\bullet})	Nitrosil katyonu (NO^+) Nitril klorit ($ClNO_2$)
Nitrik Oksid (NO^{\bullet})	Nitrosil anyonu (NO^-) Peroksinitrit ($OONO^{\bullet}$)
Diazot Trioksit ($N_2O_3^{\bullet}$)	Nitronyum katyonu (NO^{2+}) Dinitrojen trioksit (N_2O_3)
	Dinitrojen tetraoksit (N_2O_4)
	Alkil peroksinitritler ($ROONO$)
	Alkil peroksinitratlar (RO_2NO_2)
	Peroksiasetil nitrat ($CH_3C(O)O_2NO_2$)
	Peroksinitrik asid ($ONOOH$)

2.1.3. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, radikal olan ve olmayan oksijen merkezli türler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Radikal olanlar süperoksid anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi radikali ($\cdot OH$), alkoksi radikali ($RO\cdot$) ve peroksi ($ROO\cdot$) radikalidir. Radikal olmayanlar ise singlet oksijen (O_2^1) ve hidrojen peroksiddir (H_2O_2). Diğer reaktif türler ise nitrik oksid ($NO\cdot$), nitrik dioksid ($NO_2\cdot$) ve peroksinitrit ($OONO\cdot$) gibi azot bileşikleridir. Singlet oksijen ve hidrojen peroksid gibi biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri, radikal olmasalar bile serbest radikallerle ilintilendirilmiştir. Serbest radikal, atomik veya moleküler orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerir. Serbest radikaller genellikle stabil olmayan, yüksek reaktivite gösteren, enerji yüklü moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türleri veya serbest radikaller prooksidatif enzim sistemleri, lipid peroksidasyonu, irradyasyon, enflamasyon, sigara içilmesi, hava kirlenimler ve glikoksidasyon sonucu oluşabilir [27, 28]. Reaktif oksijen türlerinin çeşitli doku ve organlarda neden olduğu hastalıklar ve hasarlar Tablo 2.3’de belirtilmektedir.

Tablo 2.3. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Bazı Hastalıklar

1. Kalp hastalıkları	11. Astım
2. Bulaşıcı hastalıklar; sıtma, AIDS	12. Romatizmal hastalıklar
3. Şeker hastalığı	13. Talasemi
4. Kanser - Akciğer, Lösemi, Deri, Prostat, - Karaciğer v.b.	14. Şok
5. Yaşlanma	15. İltihabi durumlar
6. Parkinson hastalığı	16. İlaç ve toksin kullanımı
7. İskemi; beyin, kalp	17. Yanıklar
8. Anoksia	18. Epilepsi
9. Alzheimer hastalığı	19. Mide – mukoza ülserleri
10. Down sendromu	

2.1.3.1. Süperoksid Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksid radikali, en kolay ve en çok oluşan radikaldir ve başlıca 4 yolla oluşur [18]:

İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksid radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksid yapımına neden olurlar.

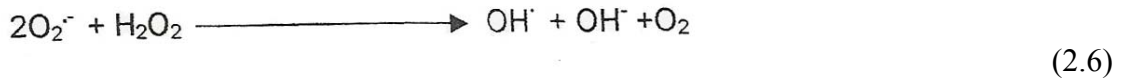
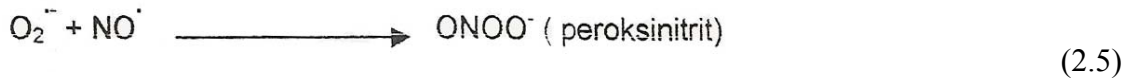


Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, enzimlerin katalitik etkisi sırasında süperoksid radikali bir ürün olarak oluşabilir.

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksid yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksid üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Süperoksid radikali, reaktifliği düşük olmasına rağmen diğer radikallerin oluşumuna yol açması bakımından önemlidir [21]. Süperoksid radikali nitrik oksitle reaksiyona girerek daha aktif bir tür olan peroksinitriti oluşturur. Aynı şekilde H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksi radikalini meydana getirir.



Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksid indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri (glutatyon, askorbik asid, tokoferol) oksitler. Süperoksid hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. [18].

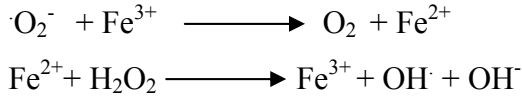
2.1.3.2. Hidroksi Radikali (HO^{\bullet})

Hidroksi radikali, Cu ve Fe gibi geçiş metalleri varlığında hidrojen peroksidin indirgenmesiyle oluşabildiği gibi hidrojen peroksidin süperoksid radikali ile reaksiyonu sonucunda da meydana gelebilen oldukça aktif bir üründür.



Hidroksi radikali, son derece reaktif bir radikal olmasından dolayı lipidler, polipeptidler, proteinler ve DNA ile reaksiyona girerek hasar yaratır. [8, 11, 29, 30].

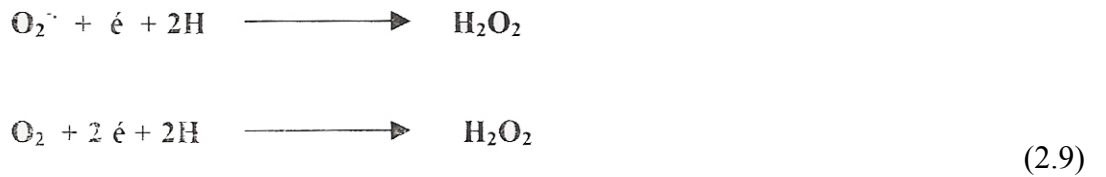
Son derece reaktif bir radikal olmasından dolayı hücre bileşenleri ile difüzyona gerek kalmadan tepkimeye girer. Tepkime Haber-Weiss reaksiyonuna göre gerçekleşir ve demir iyonu katalizörlüğünde oldukça hızlıdır.



Hidroksi radikali tiyoller ve yağ asitleri gibi daha birçok molekülden hidrojen atomları kopararak yeni radikallerin oluşumuna neden olur [23].

2.1.3.3. Hidrojen Peroksid (H_2O_2)

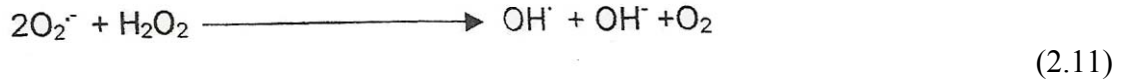
Hidrojen peroksid, oksijenin iki elektronla indirgenmesi veya süperoksidin bir elektronla indirgenmesi ile oluşan peroksidin 2 protonla birleşmesi tepkimeleri ile meydana gelir.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin süperoksid dismutaz tarafından dismutasyonu sonucu oluşur.



Hidrojen peroksidin yapısında paylaşılmamış elektron içermediği halde radikal kabul edilmesinin nedeni, hücre zarlarından su gibi kolayca geçebilmesi ve Fe^{2+} veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksid radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmasıdır.

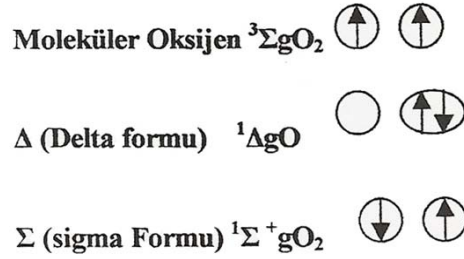


Hidrojen peroksid reaktif oksijen türleri arasında en az reaktif olanıdır ve metal iyonları bulunmadığında, fizyolojik pH ve sıcaklıkta stabildir. Hidrojen peroksid zayıf bir yükseltgeyici ve indirgeyici ajan olması nedeniyle reaktivitesi düşük olarak kabul edilmektedir [31].

Hidrojen peroksid özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir ve perferil demir oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler [18]. Bu reaksiyon radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir yada süperoksid dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral yada alkali pH'da daha belirgindir. Süperoksid radikalinin lipid çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksidin lipid çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle hidrojen peroksid kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir [32].

2.1.3.4 . Singlet Oksijen (O_2^1)

Oksijenin molekülünün elektronlarından birisinin enerji alarak spini değişmesi ile singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Enerji verilmek suretiyle meydana gelebilen oksijenin oldukça reaktif şekli olan singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır [18, 33, 34]. Singlet oksijenin moleküler orbitalleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Diğer radikal türleriyle karşılaştırıldığında memeli hücrelerinde zararsızdır ve toksik değildir. Singlet oksijen kolesterolün oksidasyonuna katılır [35]. Singlet oksijen hücre ve dokularda süperoksid anyonu, HOCl ya da kloraminlerle etkileşen hidrojen peroksid tarafından oluşturulabilir. İnsan organizmasında, singlet oksijen mikroplar, virüsler ve kanser hücrelerine karşı olan iyileştirici potansiyeli nedeniyle hem bir silahtır, hem de bir sinyaldir [28]. Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki formu vardır [8, 23]:



Şekil 2.1: Singlet oksijenin delta ve sigma formları

2.1.3.5. Peroksil ve Alkoksil Radikalleri

Peroksil radikalleri ($ROO\cdot$), oksijenin alkil radikalleri ($R\cdot$) ile reaksiyonu sonucunda oluşur. Lipid radikalleri ve oksijen arasındaki reaksiyon buna bir örnektir. Alkil peroksidlerinin ($ROOH$) dekompozisyonu sonucunda da peroksil ($ROO\cdot$) ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleri oluşabilir. UV ışınının irradyasyonu veya ortamda geçiş metallerinin bulunması peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumuna yol açan peroksidlerin hemolizine yol açabilir.



2.1.3.6. Ozon (O_3)

Atmosferin üst kısmında ve çevre kirliliği olan şehirlerde meydana gelen bu doğal bileşik, hidrokarbonlar ve azot oksitleri arasındaki fitokimyasal reaksiyonla oluşturulan en büyük kirliliktir. Ozon, bir serbest radikal değildir fakat, singlet oksijen olarak onları üretebilir, lipid peroksidasyonunu stimüle edebilir ve böylece *in vivo* olarak lipid ve protein seviyelerindeki hasarı indükleyebilir.

Ozon'un stimüle ettiği peroksidasyonun asıl kimyası tam olarak bilinmemektedir. Ozon, bir çift bağ ekleyebilir ve bir serbest radikalın oluşumunu bozabilir.

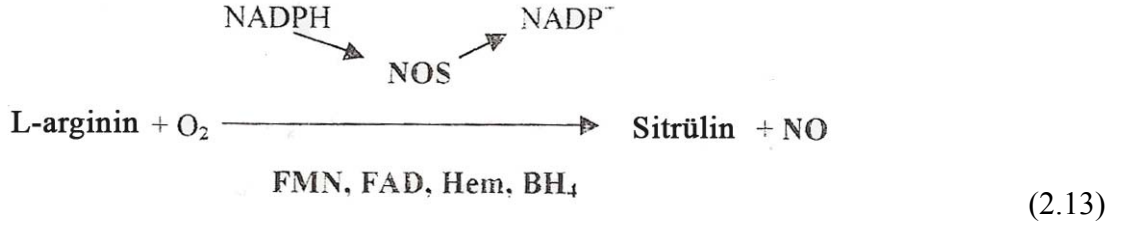
2.2.2. Reaktif Azot Türleri

Azotun oksitleri ve peroksinitrit gibi reaktif azot türleri nitrik oksidin oksijen ve süperoksitle reaksiyonundan meydana gelirler [36]. Reaktif azot türlerinin aşırı üretimi nitrosatif stres olarak adlandırılır. Nitrosatif stres proteinlerin yapısını değiştirip onların normal fonksiyonlarını inhibe eden nitrolizasyon reaksiyonlarına yol açar [37-39].

2.2.2.1. Nitrik oksid (NO^*) ve Nitrik dioksid (NO_2^*)

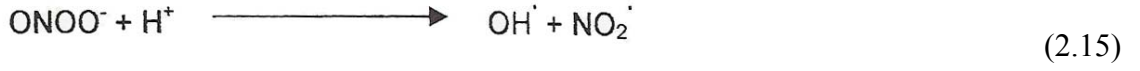
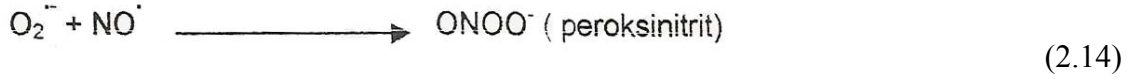
Nitrik oksid çiftlenmemiş bir elektron içeren serbest bir radikaldir ve bu nedenle Reaktif Azot Türü (RAT) olarak kabul edilir. Nitrik oksid sentaz (NOS) tarafından L-argininden oluşur [40]. Nitrik oksid kendi başına çok reaktif bir serbest radikal değildir fakat aşırı üretimi iskemi-reperfüzyon, nörodejeneratif ve romatoid artrit ve iltihaplı bağırsak hastalığı gibi kronik iltihaplı hastalıkların oluşumunda rol oynar. İnsan plazmasında açığa çıkan nitrik oksid, askorbik asid ve ürik asid konsantrasyonunu düşürüp lipid peroksidasyonunu başlatabilir [42]. Nitrik oksid, sitotoksik, antimikrobiyal aktivitelerde bir savunma molekülüdür. Ayrıca nörotransmisyon, kan basıncı düzenlenmesi, savunma mekanizması, düz kas gevşemesi ve immün savunma gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir oksidatif biyolojik sinyal molekülüdür [39, 42].

Nitrik dioksid, peroksil radikali ve NO 'nun reaksiyonundan, hava kirliliği, sigara içme gibi nedenlerle oluşur [43], askorbik asidi yükseltir [44].



2.2.2.2. Peroksinitrit

Nitrik oksid ve süperoksit radikallerinin birleşmesiyle oluşan peroksinitrit, çok güçlü bir radikaldir. Birçok biyolojik materyali doğrudan etkilemesinin yanısıra proteinlerdeki tirozini nitratlaştırarak ve düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) oksitleyerek birçok hastalığın oluşumunda önemli bir rol oynar [23].



2.3. OKSİDATİF STRES

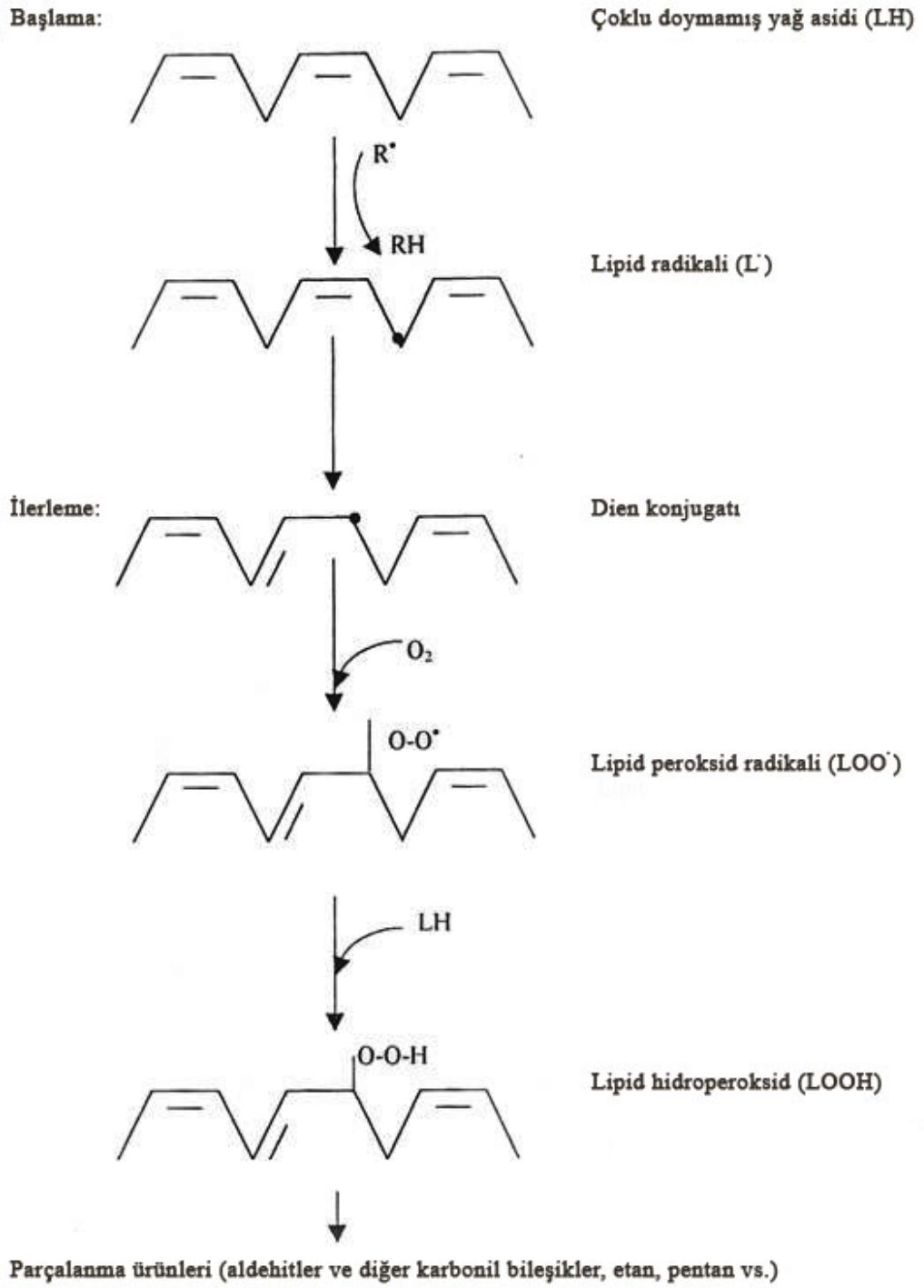
Organizmada reaktif oksijen ve azot türlerinin (ROT ve RAT) oluşum hızı ile antioksidan sistemler tarafından bunların ortamdan kaldırılma hızı bir denge içinde olup bu durum bir süreklilik arz eder. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması durumu ise ‘‘Oksidatif Stres’’ olarak değerlendirilir. Oksidatif stres durumunda reaktif oksijen ve azot türlerinin miktarında artış olur ve dolayısıyla bu ürünlerin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere metabolizmadaki birçok sistem olumsuz etkilenir [45]. Olumsuz etkilenen bu sistemler, diğer periferik sistemleri de etkilerler. Bu durum zincirleme olarak, antioksidan sistem tarafından radikal zincir reaksiyonu sonlanıncaya kadar prosesin bir yerinde devam eder. Aksi durumda bu reaktif türler hücrenin doğrudan ya da dolaylı olarak ölümüne sebep olurlar [46].

Oksidatif stresin etkilerini 3 başlık altında incelemek mümkündür:

2.3.1. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, organizmada serbest oksijen radikallerinin etkisiyle lipidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıdır. Böylece yağ asidi zinciri bir lipid radikali (L^{\bullet}) kazanır. Oluşan lipid radikali reaktiftir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Daha sonra lipid radikallerinin oksijen ile birleşmesi sonucu lipid peroksid radikalleri (LOO^{\bullet}) meydana gelir [47] (Şekil 2.2). Lipid radikalleri, membran yapısındaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açar [48]. Lipid oksidasyonu bir serbest radikal zincir reaksiyonudur ve reaktif oksijen türleri bu reaksiyonu hızlandırabilir. Hücre membranları, dışında proteinler bulunan fosfolipid çift tabakalardan oluşur ve lipid oksidasyonunun direkt hedefidir [49]. Hücre membranlarının lipid oksidasyonu arttıkça, lipid fazın yüzey yükünün polaritesi ve protein oligomerlerinin oluşumu artar. Malondialdehid lipid oksidasyonunun bir ürünüdür ve proteinlerle, fosfolipidlerle, ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek immun sistemin disfonksiyonuna yol açan yapısal değişikliklere neden olur. Lipid oksidasyon ürünlerinin artması diyabet, ateroskleroz, karaciğer hastalığı, apopleksi ve inflamasyon durumlarında görülür [50]. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları, iki lipid peroksid radikali etkileşinceye kadar devam etmekte ve siklik peroksid oluşumu ile sonlanmaktadır [35]. Oksidasyonun ilk ürünü peroksidlerdir ve kokusuzdurlar, fakat daha sonra hidrokarbonlar, aldehitler, ketonlar, alkoller ve organik asidlere parçalanırlar [51, 52].

Lipid peroksidasyonu sırasında çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) hidrojenini kaybeder ve moleküler oksijenle reaksiyona girer. Hücre membranında bol miktarda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları reaktif oksijen metabolitleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Açığa çıkan lipid peroksidler de reaktif oksijen metabolitlerine benzer şekilde hücresel komponentler üzerinde toksik etkiler gösterirler [53]. Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak esneklik, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının agregasyonu gibi intrinsek membran özelliklerini değiştirme yeteneğine sahip olması yanında DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir, amino grupları arasında çapraz bağlanmalara yol açabilir; bu özellikleri ile malondialdehid kültür hücreleri için genotoksik, mutajenik ve karsinojeniktir [54].



Şekil 2.2: Lipid peroksidasyonu

2.3.2. Protein Oksidasyonu

Reaktif oksijen türleri proteinlere saldırarak karboniller ve metiyonin sülfoksid, 2-oksohistidin ve protein peroksidler de dahil olmak üzere diğer amino asit modifikasyonlarına yol açarlar [55]. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır [56]. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikal reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Bu etkilenme sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyon sonucu immunoglobulin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler [57].

Proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır [23]:

Amino asitlerin modifikasyonu

Proteinlerin fragmentasyonu

Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar

Protein yapılarındaki hasarın gösterilmesi için protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir [48].

2.3.3. DNA Hasarı

Her türlü radyasyonun etkisiyle (U.V., görünür ışık, ısı ve X ışınları v.b.) hücrelerde iyonlar, serbest radikaller ve enerji kazanmış moleküller oluşur. Hidroksil radikalleri, DNA'daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz-fosfatlarla reaksiyon vererek hücrede mutasyon meydana getirirler. Reaksiyon sonucunda, DNA bazları modifiye olur ve bu da riboz-fosfat zincirinin kırılmasına yol açar. İn vitro olarak sulu çözeltilerde yapılan çalışmalarda, HO[•] radikalinin, deoksiriboz ve tetrasiklik bazlarla kolaylıkla reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Fakat, çift zincirli DNA molekülünde, heterosiklik bazlar HO[•] radikallerine karşı sterik olarak çok iyi korunmuşlardır. Ayrıca, enzimatik radikal yakalayıcılar, öncü HO[•] radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar [58].

Aktif olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksid, membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak mutajenez, karsinojenez ve hücre ölümü meydana getirebilir. Bu yüzden DNA, serbest oksijen radikallerinin kolay zarar verdiği önemli bir hedeftir [59, 60].

Reaktif oksijen metabolitlerinin aşırı miktarlarda üretimi, hücre harabiyeti oluşturabilir. Bunlardan hidrojen peroksid, hızla çevre hücrelere geçerek hem glikolitik ve hem de oksidatif fosforilasyon yollarını etkilerken adenosin trifosfat (ATP) sentezinin inhibisyonuna da neden olmaktadır. Glikolitik yolda hidrojen peroksidin, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GADPH) üzerine etkisi ve indirekt olarak da GADPH kofaktörü olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) konsantrasyonunda azalma oluşturması sonucu ATP sentezi bozulmaktadır. Hidrojen peroksidin bu son etkisinin DNA onarımında rol oynayan poliadenozin difosfat riboz polimeraz enziminin aktivasyonu sonucu geliştiği bildirilmektedir [61]. Aktifleşen ADP-riboz-polimeraz enzimi substratı olan NAD'i bol miktarda kullanarak konsantrasyonunu azaltır. NAD konsantrasyonunda azalma, pH azalması ile birleşince glikolitik yolun inhibisyonuna neden olur. Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonlarında (20-80 /JM) bile birçok hücrede DNA harabiyeti gelişir, bunun sonucunda bir geçiş metalinin de varlığı ile hidroksil radikali açığa çıkar. DNA'da gelişen bu şekildeki harabiyet malign transformasyonlara da yol açabilir. DNA harabiyetinden sadece hidrojen peroksid değil ayrıca superoksid radikali [62] ve hidroksil radikali [63, 64] de sorumlu olabilir. Oksidanlara maruz kalan hücrelerde çok kısa zaman birimi içinde DNA harabiyetinin geliştiği ileri sürülmektedir [61]. Reaktif oksijen metabolitlerinin hücre harabiyeti oluşturucu başlıca etkileri DNA harabiyeti ile yakın ilişkidir. Nitekim, bu metabolitlerin hücre membranında başlattıkları lipid peroksidasyonunun ürünleri de yine DNA harabiyetine yol açmaktadır [65].

2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ VE ANTIOKSİDANLAR

Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek, oluşan serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya serbest radikallerin olumsuz etkilerini gidermesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanlar hücrelere zarar veren serbest radikalleri, reaktif oksijen türlerini etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Halliwell ise antioksidanları, düşük konsantrasyonlarda karbohidrat, lipid, DNA, protein gibi okside olabilen maddelerle karşılaştığında, bu maddelerin oksidasyonunu geciktiren veya önleyen maddeler olarak tanımlamıştır [2, 66].

Antioksidanlar vücutta endojen olarak üretilbildikleri gibi, eksojen olarak gıda yolu ile de alınabilmektedir. Besinlerde bulunan antioksidanlar insan sağlığına faydalı olduğu gibi gıda maddelerinin raf ömrünü uzatarak ve oksidasyonu geciktirerek veya inhibe ederek besin değerlerindeki kaybı azaltmaktadırlar [67- 69].

Besin maddelerinde bulunan ve insan vücudunu serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler, flavonidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Antioksidan içeren gıda maddeleri ile beslenme sonucunda kanser, kalp ve damar hastalıklarının oranında büyük ölçüde azalma görüldüğü saptanmıştır [70, 71].

Ayrıca yaşlanmaya karşı mücadele edilmesinde ve bağışıklık sistemini de olumlu yönde etkilemesi nedeniyle antioksidanlar önemli maddelerdir. Antioksidanlar biyokimyacılar ve diğer sağlık uzmanları için de önemli olan maddelerdir. Vücudu reaktif oksijen türlerine (ROT), reaktif azot türlerine (RAT) ve reaktif klor içerikli maddelere karşı korurlar. Piyasada en çok kullanılan sentetik antioksidanlar butillenmiş hidroksianizol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve tersiyer butilhidrokinon (TBHQ) dur [72].

Bu maddeler serbest radikalleri nötralize ederek organizmayı hastalıklara karşı, besin maddelerini ise bozulmaya karşı korumaktadırlar. Ancak bu bileşiklerin toksik mutajenik etkileri göstermeleri nedeni ile bazı Avrupa ülkeleri ve Japonya'da

kullanılmalarına izin verilmemiştir. Bu nedenle günümüzde bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlar üzerindeki araştırmalar daha da önem kazanmıştır.

Antioksidanlar hücrelere zarar veren serbest radikalleri, reaktif oksijen türlerinin neden oldukları hasarı enzimatik ve non-enzimatik savunma ile etkisiz hale getirirler. Enzimatik savunma süperoksid dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidaz gibi enzimler tarafından sağlanırken, non-enzimatik savunma ise albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asid gibi çeşitli moleküllerle sağlanır.

2.4.1. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar

Antioksidanlar kaynaklarına göre sınıflandırıldıklarında endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlardan endojen antioksidanlar ise enzimatik ve nonenzimatik olarak iki grupta incelenir. Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar Tablo 2.4'te gösterilmektedir:

Tablo 2.4: Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar

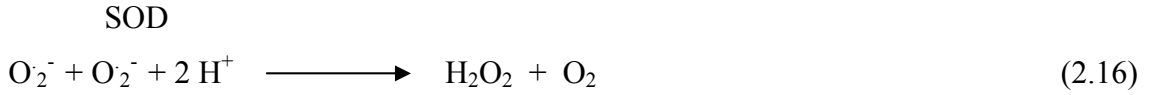
ENDOJEN	EKSOJEN
<i>Enzimatik</i>	Albumin
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	Aneztezikler
Glutasyon Redüktaz (GSH-R)	Asetil Sistein
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	Besinlere Eklenenler
Hidroperoksidaz	- BHA
Katalaz (CAT)	- BHT
Peroksidaz	- Etoksigin
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	- Fe Süperoksid Dismutaz
(Solunum zinciri son enzimi)	- Propil Gallat
Süperoksid Dismutaz (SOD)	- Sodyum Benzoat
<i>Nonenzimatik</i>	Desferroksamin (Fe tutucu)
Albumin	DMSO
Askorbik asid (C vitamini)	Ebselen
Alfa- Tokoferol (E vitamini)	Flavonoidler
Beta-Karoten	Kalsiyum Kanal Blokerleri
Bilirubin	Ksantin Oksidaz İnhibitörleri
Ferritin	- Allopürinol
Glutasyon	- Folik asid
Haptogloblin	-Oksipürinal
Hemoglobin	- Pterin Aldehit
Laktoferrin	Mannitol
Melatonin	Probukol
Retinoik asid	Rekombinant
Seruloplazmin	Antioksidan Enzimler (r-SOD)
Sistein	Serüloplazmin
Transferrin	Steroid Yapıda Olmayan Antiflematuarlar
Ubikinol	Troloks
Ürat	Taurin

2.4.2. Enzimatik Savunma

Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikli etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir [8].

2.4.2.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Süperoksid dismutaz (EC 1.15.1.1), reaktifliği yüksek olan süperoksid serbest radikalini daha sonra katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından yok edilebilmesi için daha az reaktif olan hidrojen perokside dönüştürür.



Süperoksid dismutazın başka bir görevi ise dehidratazları (dihidroksi asid dehidrataz, akonitaz, 6-fosfoglukano dehidrataz ve Fumaraz A ve B) süperoksid serbest radikali tarafından inaktivasyonuna karşı korumaktır [73].

Süperoksid dismutazlar kofaktörlerine göre dinükleer Cu, Zn içeren ve mononükleer Mn, Fe ve Ni içerenler olmak üzere dört sınıfa ayrılmıştır [74]. Cu/Zn SOD ağırlıklı olarak ökaryotların sitosollerinde, kloroplastlarda ve bazı bakteri türlerinde, Mn SOD ökaryot mitokondrisinde ve prokaryotlarda, Fe SOD ise prokaryotlarda bulunur [75].

- *Mangan Süperoksid Dismutaz*

Mn-SOD her bir altbiriminde bir mangan atomu içeren homotetramer (96 kDa) bir moleküldür. Süperoksidin iki aşamalı bozunması esnasında önce Mn^{+3} , Mn^{+2} ye, sonra da tekrar Mn^{+2} , Mn^{+3} 'e dönüşür. Mitokondrideki solunum zinciri oksijen radikallerinin başlıca kaynağıdır. Mn-SOD süperoksid radikalini gidermede görev yapan primer bir antioksidandır [76]. Hücrel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır.

- *Cu/Zn Süperoksid Dismutaz*

Cu-Zn SOD, 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein altbirimi içerir ve her bir altbirimde Cu ve Zn atomları bulunur [77, 78].

- *Ekstrasellüler Süperoksid Dismutaz*

Ekstrasellüler SOD, tetramerik yapıda, Cu ve Zn içeren bir glikoproteindir. Heparin ve heparan sülfat gibi bazı glikozaminoglikanlara yüksek affinitesi vardır. Dokularda ve ekstrasellüler sıvılarda bulunarak, plazma, lenf ve sinovial sıvılardaki SOD aktivitesinin önemli bir kısmını oluşturur [79].

- *Nikel Süperoksid Dismutaz*

Ni-SOD, herbiri 13.4 kDa'luk dört alt birimden oluşmuştur. 70 °C'ye kadar ve pH: 4.0-8.0 arası stabildir. Amino asid kompozisyonu Fe-SOD, Mn-SOD ve Cu,Zn-SOD'dan farklılık gösterir [80].

2.4.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6), 60 kDa'luk 4 altbirimden oluşan hem içeren tetramerik bir enzimdir. Her bir molekülünde 4 ferriprotoporfirin içerir ve molekül ağırlığı 240 kDa'dur. Katalaz bilinen en etkin enzimlerdendir [81]. Peroksizomlarda lokalizedir ve SOD'un oluşturduğu H₂O₂'i, katalaz peroksidazlarla beraber su ve moleküler oksijene parçalar. Katalaz aktivitesi eritrosit, böbrek ve karaciğerde yoğundur [82].



2.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), selenyum içeren ve çeşitli hidroperoksidlerin glutasyon ile indirgenmesini katalizleyerek memelileri oksidatif strese karşı koruyan bir enzimdir.



Glutasyon peroksidazın H_2O_2 'e karşı K_m 'i katalaza göre daha düşüktür. Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i glutasyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite gösterir.

2.4.1.4. *Glutasyon -S- Transferaz (GST)*

Glutasyon-S-transferazlar (EC 2.5.1.18), detoksifikasyon enzimlerinin önemli bir sınıfıdır. GST'ler tripeptid glutasyonun lipofilik bileşiklerin elektrofilik merkezlerine konjugasyonunu katalizleyerek, çözünürlüğünün artmasını ve hücreden salgılanmasına yardım eder. Oksidatif stres esnasında, makromoleküllerin in vivo yıkılma ürünleri olarak oluşan reaktif doymamış karboniller, reaktif DNA bazları, epoksidler ve organik hidroperoksidler gibi endojen substratları da içeren geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. Glutasyon transferazlar dokuları oksidatif hasarlara ve oksidatif strese karşı korumada hayati önem taşırlar.

2.4.1.5. *Glutasyon Redüktaz*

Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7), yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 altbirimden oluşan bir dimerdir. Her bir alt ünite NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve arayüz alan olmak üzere 3 yapısal alan içerir. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında elektronlar sıklıkla NADPH'tan FAD'ye transfer edilir [83]. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve majör kaynağı pentoz fosfat yoludur [60].

2.4.3. **Non-Enzimatik Antioksidan Savunma**

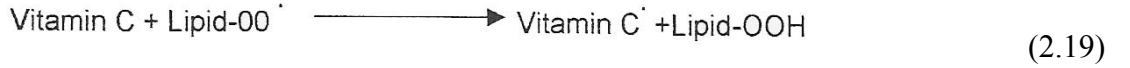
Non-enzimatik antioksidan savunmada esansiyel mikronutrient bileşiklerin önemli payı vardır. Askorbat (C vitamini) suda çözünen önemli bir antioksidandır. İndirgeyici gücü radikal ve radikal olmayan redoks reaksiyonlarında kullanılır.

2.4.3.1. *Tokoferoller ve Tokotrienoller (E vitamini)*

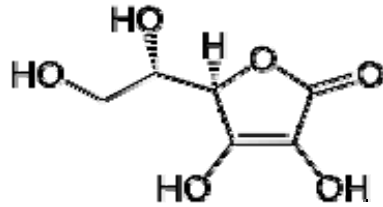
Tokoferoller bir kroman halkası ve uzun doymuş bir fitil zincirinden oluşurlar. Biyolojik membranların doğal bileşenlerindendirler. Başlıca bitkisel yağlarda, ceviz, fındık gibi yağlı tohumlarda, süt ve yumurtada bulunur [84, 85]. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidirler. Tokoferoller membranda ve LDL'deki çoklu

2.4.3.2. Askorbik Asid (Vitamin C)

C vitamini veya L-askorbik asid suda çözünebilir ve birçok fizyolojik şartlarda indirgenmiş halde bulunur (Şekil 2.4). Hücre dışı sıvılarda en önemli antioksidandır [90] ve antioksidan özelliğinin yanı sıra birçok hücre sel aktiviteye sahiptir. C vitaminin süperoksidi, hidrojen peroksidi, hipokloriti, hidroksi radikalini, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni etkin bir şekilde yakalayabildiği görülmüştür [91, 92]. İnsanlar C vitaminini vücutta sentezleyemezler [93], bu nedenle C vitamini ihtiyaçlarını taze sebze ve meyvelerden karşılarlar [94]. C vitamini vücutta hidroksilasyon reaksiyonları, demir emiliminde görev alır. Ayrıca sulu peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan görevini de yerine getirir [66, 95].



Askorbik asid peroksil radikallerini temizlemenin yanında eritrosit membranı yüzeyinde nitroksid radikalini temizleyerek β -nikotinamid adenin dinükleotit, β -nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ve ısı komponentlerini artırır [96]. Ayrıca askorbik asid lipid peroksidasyonunun inhibisyonu esnasında tokoferol radikalinin α -tokoferole dönüşmesine yardım eder, doğrudan doğruya karsinojen oluşumunu baskılar, immün yeterliliği arttırır ve hyaluronidaz aktivitesini inhibe eder [5, 97].

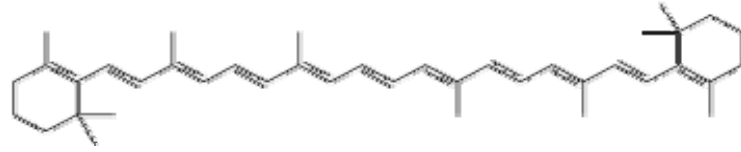


Şekil 2.4. C vitamininin kimyasal yapısı

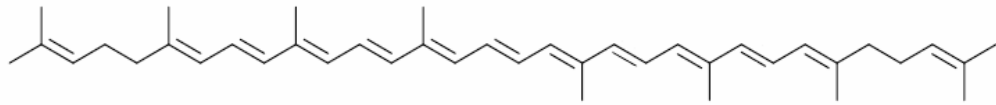
C vitamini en çok yabani gül tohumu, limongiller, kuş üzümü, taze sebze ve meyvelerde, özellikle portakal, greyfurt gibi turunçgillerde, çiğ lahana, domates ve şalgamda bulunur. Vücutta depolanmadığından, her gün düzenli olarak alınması gerekir [98].

2.4.3.3. Karotenoidler

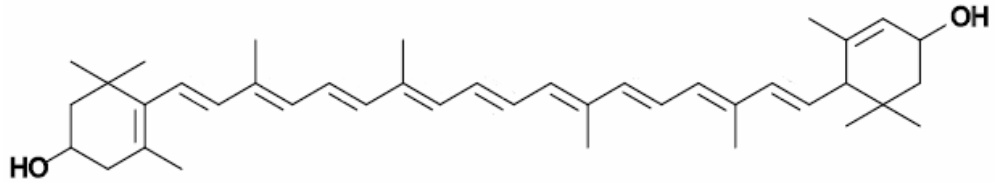
Karotenoidler bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen, hayvanlarca sentezlenemeyen doğal pigmentlerdir [100]. Yapısında bulunan çifte bağlardan dolayı sarı, portakal veya kırmızı renklindedir. Yapılarındaki konjuge çift bağlar, kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerini etkiler [101]. Karotenoidler teraterpenoidlerin bir grubudur. İki sınıf karotenoid vardır; karotenler ve ksantofiller. Karotenler hidrokarbon karotenoidlerdir, ksantofillerse hidroksil, metoksil, karboksil, keto, veya epoksi grupları şeklinde oksijen içerirler. Likopen ve β -karoten tipik karotenlerdir. Yeşil yapraklardaki lutein ve mısırdaki zeaksantin ise ksantofildirler (Şekil 2.5).



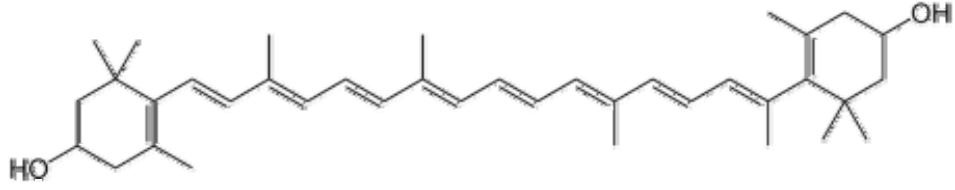
β -Karoten



Likopen



Lutein



Zeaksantin

Şekil 2.5. β -Karoten, Likopen, Lutein ve Zeaksantin'in kimyasal yapısı

Karotenoidlerin ateroskleroz, katarakt, yaşa bağlı kas dejenerasyonları, ve multipl skleroz gibi çeşitli radikal kaynaklı hastalıkları önlediği bildirilmiştir.

Karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutmalarından kaynaklanmaktadır [102]. Likopen, doğal karotenoidler arasında en etkili singlet oksijen tutucularındandır [95]. β -Karoten özellikle düşük oksijen konsantrasyonundan kaynaklı gerilimlerde peroksil radikali tutucusudur. β -karoten, α -tokoferolden daha düşük antioksidan aktiviteye sahiptir.



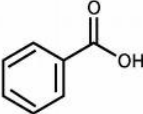
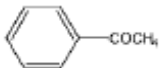
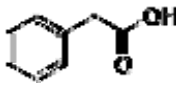
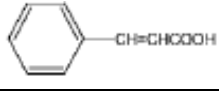

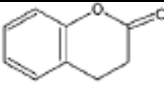
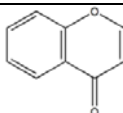
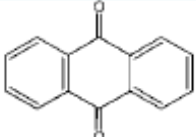
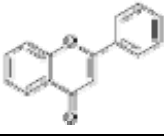
Karotenoidler renkli meyve ve sebzelerde bulunmaktadırlar. Şeftali, havuç, bal kabağı ve patates α ve β -karoten içerir. Domates, kavun ve greyfurt ise likopen kaynağıdır [103].

En yaygın kullanılanı olan β -karoten aynı zamanda vitamin A öncülüdür. Vücutta vitamin A oluşumu için gereklidir [100, 104].

2.4.3.4. Polifenoller

Bitkilerde, fenolik bileşikler veya polifenollerin 8000'den fazla türü bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları Tablo 2.5'te gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerin antioksidan, antimutajenik ve serbest radikal giderme etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda yüksek oranlarda fenolik bileşiklerin tüketilmesinin kardiyovasküler hastalıkları ve belli kanser türleri riskini azalttığını göstermiştir [105].

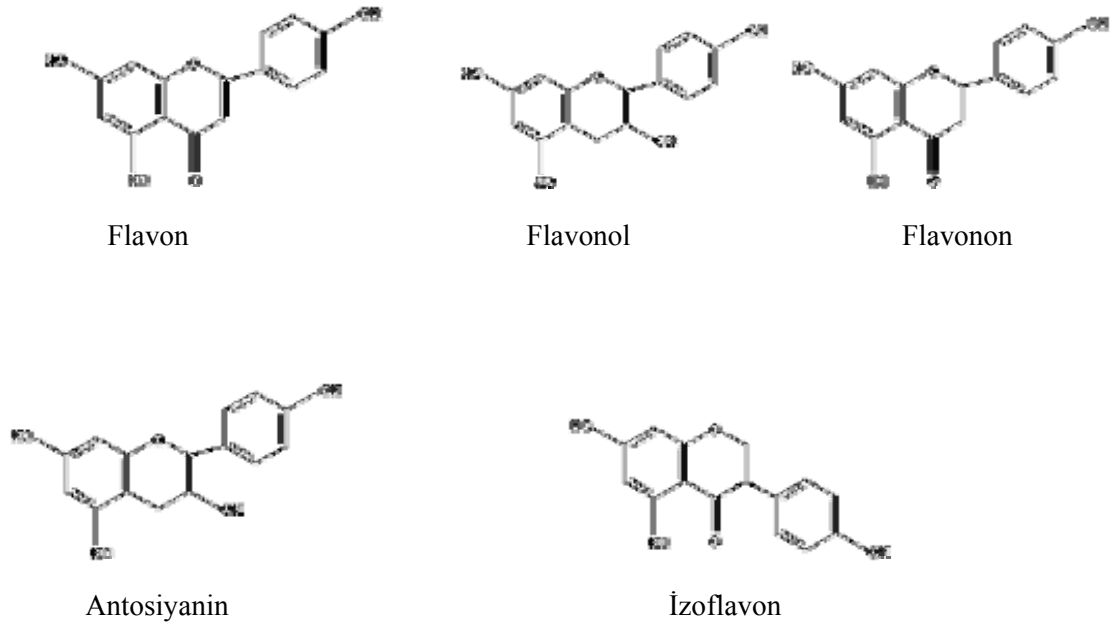
Tablo 2.5. Fenolik bileşenlerin sınıfları

Sınıf	Temel İskelet	Temel Yapı
Basit fenoller	C ₆	
Benzokinonlar	C ₆	
Fenolik asitler	C ₆ -C ₁	
Asetofenonlar	C ₆ -C ₂	
Fenil asetik asitler	C ₆ -C ₂	
Hidroksisinasamik asitler	C ₆ -C ₃	
Fenil propenler	C ₆ -C ₃	
Kumarinler	C ₆ -C ₃	
Kromonlar	C ₆ -C ₃	
Antrakinonlar	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoidler	C ₆ -C ₃ -C ₆	

2.4.3.5. Flavonoidler

Flavonoidler insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan, bitkilerde doğal bir şekilde oluşan bileşiklerdir. İnsan metabolizmasında sentezlenemezler. 4000'den fazla flavonoid bulunmuştur.

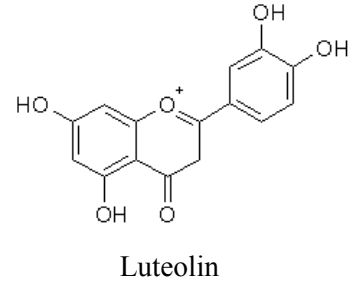
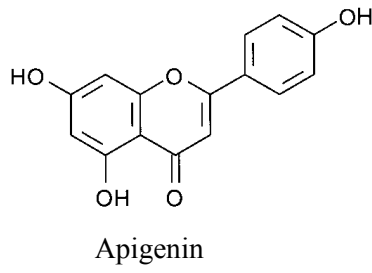
Flavonoidler, yapısal olarak genellikle C₆ - C₃ - C₆ karbon iskeletiyle karakterize edilirler (şekil 2.6). Aglikon veya glikozid şeklinde bulunabilirler.



şekil 2.6. Flavonoidlerin kimyasal yapıları

Flavonoidler, reaktif oksijen ve azot türlerini yakalama özelliğine sahiptirler. Flavonoidler, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltmada mitokondriyel süksinoksidaz, NADH-oksidaz ve araşidonik asid metabolizmasına katılan enzimler gibi indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri etkileyerek aktif rol oynarlar [106]. Flavonoidlerin aterosklerozda önemli rol oynayan LDL peroksidasyonunu önlediği bildirilmiştir.

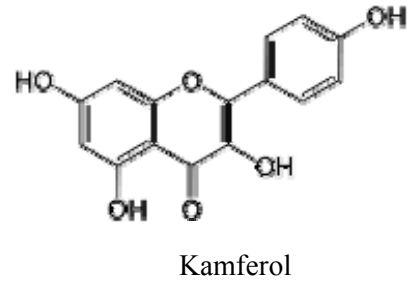
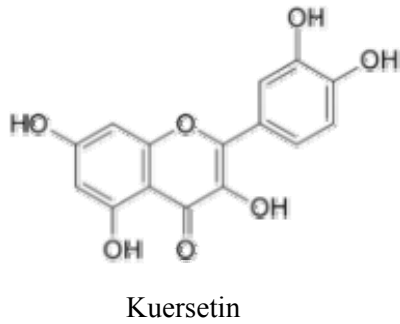
Flavonlar, meyvelerde çok bulunmalarına rağmen tahıl ve otlarda bulunurlar. En çok bilinenleri apigenin ve luteolindir. Apigenin maydanozda bulunmaktadır. Luteolin ise tahıllarda ve otlarda bulunmaktadır (şekil 2.7).



Şekil 2.7. Apigenin ve luteolinin kimyasal yapısı

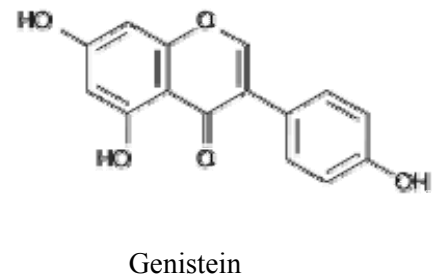
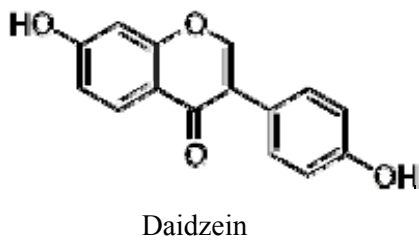
Flavonlar, yüksek konsantrasyonlarda veya metal iyonlarıyla kompleks oluşturduklarında bitki dokusunun rengine ve lezzete katkıda bulunurlar.

Flavonollerin, en önemli bileşikleri kuersetin ve kamferoldür (Şekil 2.8). Kuersetin meyve ve sebzelerde bolca bulunur.



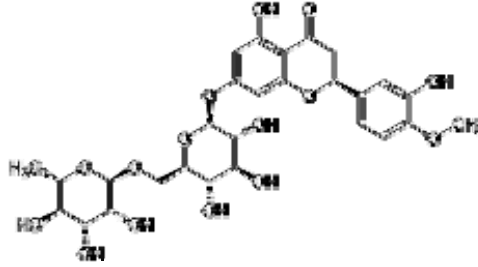
Şekil 2.8. Kuersetin ve kamferolün kimyasal yapısı

İzoflavonoidler, östrojenik aktiviteleriyle bilinirler. En önemli bileşikleri; daidzein ve genisteindir (Şekil 2.9). En çok kuru baklagillerde bulunurlar. Soya fasulyesi önemli bir daidzein ve genistein kaynağıdır.



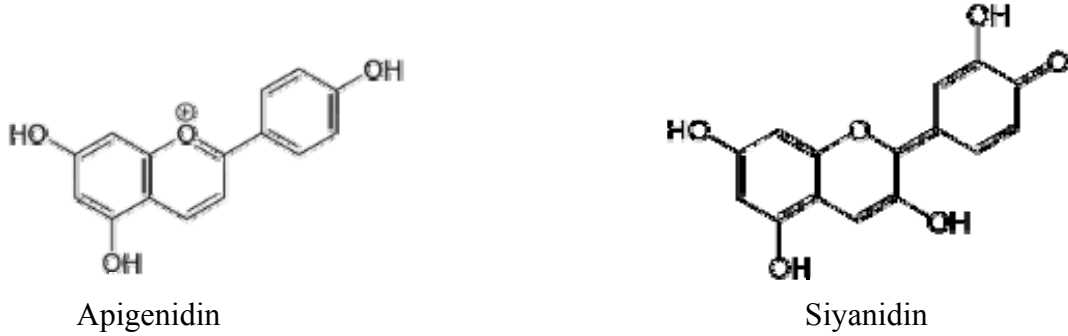
Şekil 2.9. Daidzein ve genisteinin kimyasal yapısı

Flavononlar, flavonların dihidro türevleridir. Flavononların ana kaynağı turunçgillerdir. Hesperidin kimyon ve nanede bulunur (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Hesperidin kimyasal yapısı

Antosiyanidinler doğal bitki pigmentleridirler ve glikozidleri antosiyaninler olarak bilinirler. Antosiyaninler, dutların, kirazların, eriklerin, kırmızı lahananın, patlıcanın ve turpların kırmızı ve mavi rengini verirler. Antosiyaninlerin renkleri pH'a bağlıdır. Meyvelerdeki antosiyanin içeriği meyve olgunlaştıkça genellikle artar. Antosiyaninler, içecek ve diğer gıdalarda renklendirici olarak kullanılırlar. En önemlileri; apigenidin, siyanidin (Şekil 2.11), malvidin ve delfinidindir.



Şekil 2.11. Apigenidin ve siyanidin kimyasal yapısı

Flavanların yapıları ve isimlendirilmeleri karışıktır. Monoflavan, biflavan ve triflavan olarak bulunurlar. Monoflavanlar, olgun meyvelerde ve taze yapraklarda bulunurlar. Çayda önemli oranda flavan vardır. Biflavanlar ve triflavanlar, meyve ve tahıllarda bulunurlar. Elma, böğürtlen, kızılıcık, üzüm, şeftali ve çileklerde bulunurlar. Tahıllarda ise darı ve arpa tanelerinde bulunurlar [107].

2.4.3.6. *Glutasyon (GSH)*

Başta karaciğer olmak üzere pekçok dokuda bulunan, glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen tripeptid yapısındaki GSH oksidatif strese ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar. Dokuda antioksidan savunmanın bir elemanıdır. GSH peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH transferaz gibi enzimlerin substratı veya kofaktörüdür. Hücrelerin içinde toplanmış okside glutasyon ve GSH/GSSG oranı organizmadaki oksidatif stresin bir ölçümüdür. GSSG'nin konsantrasyonunun çok yüksek olması oksidatif olarak birçok enzime zarar verebilir.

2.4.3.7. *Albumin*

Albumin vücutta birçok fonksiyonuna ek olarak bakır iyonunu bağlama yeteneğine de sahiptir ve böylece bakır iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

2.4.3.8. *Bilirubin*

İn vivo ortamda bilirubin, lipid peroksidasyonunda antioksidan olarak görev yapar.

2.4.3.9. *Ürik Asid*

İnsanlarda purin nükleozidleri olan adenzin ve guanozin katabolizmasının temel ürünü ürik asidir. Metal bağlayıcı ve serbest radikal temizleyici olarak rol oynar.

2.4.3.10. *Selenyum*

Selenit ve selenometionin, UV ışınları ile oluşan oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde azaltmaktadır.

2.4.3.11. *Lipoik Asid*

Lipoik asid, ette, karaciğerde ve kalpte bulunur. Proteinlerin oksidatif hasarını önler. Kan glikoz konsantrasyonunu düşürmede önemli rol oynar.

2.4.4. Sentetik Antioksidanlar

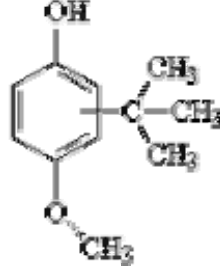
Sentetik olarak kullanılan antioksidanlar bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütihidrokinon (TBHQ), propil gallat (PG), Troloks ve diğer sentetik antioksidanlardır [108]. En yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmektedir [109, 110]. Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiğine dair bazı çalışmalar ve farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Yapılan bazı araştırmalar, BHT gibi bazı sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılamadığını ve adipoz dokuda depolandığını göstermiştir [20]. Sentetik antioksidanlar geniş bir kullanım alanına sahip olmalarına rağmen, istenilmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımları ciddi bir şekilde sınırlandırılmıştır.

2.4.4.1. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA)

BHA beyaz, mumsu katı bir yapıya sahip, erime noktası yaklaşık 48-63°C olan ve hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilir ancak suda çözünmeyen bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.12). Beyaz mumsu parçacıklar halindedir. Gıdalarda kullanımına ilk olarak 1948 yılında ABD'de izin verilmiş olup, günümüzde pek çok ülkede gıda olarak tüketilen katı ve sıvı yağlarda kullanılmaktadır. Tersiyer butil grubunun, fenolik hidroksil (-OH) grubu üzerinde koruma meydana getirdiği ileri sürülmektedir. Bu durum molekülü dış reaksiyonlardan korumakta ve daha az uçucu ve daha çok yağda çözünür şekle dönüştürmektedir. Yapısındaki hidroksil gruba karşı orto veya meta pozisyonunda yer alan tersiyer butil grup nedeni ile BHA'ya "engelleyici fenol" adı verilmektedir. Bu sterik engellemenin, tersiyer butil grubun fenolik yapının antioksidatif aktivitesi ile girişim meydana getirmesi ve bu nedenle BHA'nın bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına neden olduğu öne sürülmektedir .

BHA, bitkisel yağlarda etkin bir antioksidan olmamasına karşın, genellikle diğer antioksidanlar ile (gallatlar) beraber kullanıldığında hem fenolik yapıda bulunan antioksidanların bir arada kullanılması ile elde edilen sinerjistik etki, hem de BHA'nın yağın kullanıldığı ürünü koruyucu etkisinden faydalanılmaktadır. BHA fırınlama veya kızartma gibi yüksek sıcaklık işlemleri uygulanan yağlarda kullanıldığında, kolaylıkla algılanabilen keskin bir fenolik koku oluşturmaktadır. BHA özellikle uçucu yağların

renk, tat ve kokularının korunmasında etkilidir. Özellikle tahıl ve şekerli ürünlerde kullanılır. BHT ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösterdiği öne sürülmektedir.

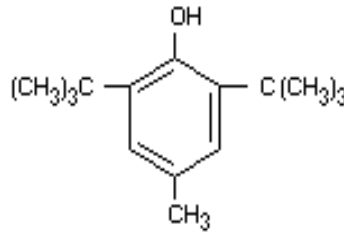


Şekil 2.12. BHA'nın kimyasal yapısı

2.4.4.2. Bütilenmiş Hidroksitoluen (BHT)

BHT beyaz kristal görünümündedir. BHT'nin gösterdiği özellikler büyük ölçüde BHA'ya benzemektedir (Şekil 2.13).

Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), (C₁₅H₂₄O); 2,6-ditertsiyer butil-4-metil fenol'un, 1954 yılında gliseridler üzerinde etkili ve koruyucu bir antioksidan olduğunun belirlenmesi sonucunda gıda olarak tüketilen yağlarda ve diğer bazı gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır .



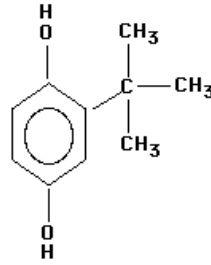
Şekil 2.13. BHT'nin kimyasal yapısı

Bu madde BHA gibi bitkisel yağlarda düşük aktiviteye sahip olmasına karşın diğer antioksidanlar ile beraber kullanıldığında yağın ilave edildiği gıdayı koruma özelliğinden yararlanılmaktadır. BHA ve BHT birlikte kullanıldığında, sinerjistik etkiden bahsedilmektedir. Fındık, ceviz gibi fazla yağlı tohumlarda oksidatif reaksiyonları engellemede, bu kombinasyon çok iyi sonuç vermektedir.

2.4.4.3. Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ)

TBHQ yağlarda orta derecede, suda ise çok az çözünebilir, beyaz ile sarımsı kahverengi arası renkte, kristal yapıda bir madde olup erime noktasının 127°C olduğu belirtilmektedir (Şekil 2.14).

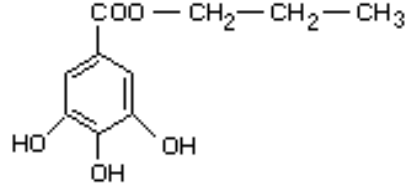
TBHQ'nun kullanımına ilk kez 1972 yılında izin verilmiştir. Monotersiyer butil hidrokinon yapısında olan bu antioksidan, beyaz, kristalimsi ve karakteristik kokusu olan bir maddedir. Son yıllarda özellikle gıdaların işlenmesinde ve insan beslenmesinde yer alan bitkisel yağlar oksidasyona karşı oldukça duyarlı oldukları için kuvvetli antioksidanlara olan gereksinimleri arttırmıştır. Günümüzde tersiyer butil hidrokinonun bitkisel yağlarda stabiliteyi arttırmak amacı ile kullanımına bir çok ülke tarafından izin verilmektedir. TBHQ'nun bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi diğer antioksidanlara göre daha fazladır. TBHQ doymamış bitkisel yağlarda ve birçok yenilebilir hayvansal yağlarda çok etkili bir koruyucudur. Demir metali varlığında bile rengi değişmez ve ilave edildiği materyalin rengini ve kokusunu değiştirmez.



Şekil 2.14. TBHQ'nun kimyasal yapısı

2.4.4.4. Propil Gallat (PG)

Propil gallat, ticari olarak gallik asidin propil alkol ile esterifikasyonu sonucu üretilir (Şekil 2.15). Beyaz renkli kristal toz halinde bir madde olup suda az çözünür, erime noktası da 148°C' dir. Propil gallat, demir iyonları ile mavi-siyah renkte bir kompleks oluşturur. Bunu önlemek için PG daima sitrik asitle birlikte kullanılır. Propil gallatlar, BHA ve BHT ile iyi sinerjistik etki gösterirler. PG, bitkisel ve hayvansal yağlarda, et ürünlerinde, taze ve dondurulmuş salam ve sosislerde antioksidan olarak kullanılır.

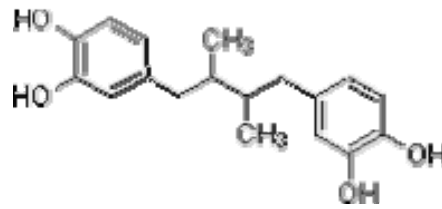


Şekil 2.15. Propil gallatın kimyasal yapısı

2.4.4.5. Nordihidroguayeretik Asid (NDGA)

NDGA, *Lurra divaricata* bitkisinden doğal olarak elde edilen ayrıca yapay olarak üretililebilen bir antioksidandır (Şekil 2.16). Fırıncılık ürünlerinde, eterik yağlar, domuz yağı ve balık yağlarında kullanılmaktadır. ABD'deki uygulamalarda NDGA limon asidi, tartarik asid, askorbik asid gibi maddelerle birlikte kullanılmaktadır. NDGA'nın bazı ülkelerde gıdalara katılmasına izin verilmektedir.

NDGA'in en önemli özellikleri gallatlarda olduğu gibi ısıya karşı duyarlı olması ve kalıntı demir ile renk bozulmasına neden olabilmesidir. Bu maddenin gıdalarda kullanımına ülkemiz de dahil olmak üzere pek çok ülkede izin verilmemektedir.



Şekil 2.16. NDGA'nın kimyasal yapısı

2.5. ISPIT

Ülkemiz zengin bir flora ve kültür mirasına sahip olan Anadolu'da yabancı bitkilerin halk arasındaki tedavi, gıda ve diğer amaçlarla kullanılmasını konu alan bilimsel nitelikte çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır [111- 115].

Trachystemon orientalis (L.) G. Don (Boraginaceae) türü 30-40 cm yükseklikte, Kuzey Anadolu'da yetişir, rizomları yumruya benzer, kırmızımsı-mavi çiçekli, yaprakları sert tüylü, çok yıllık bir orman altı bitkisidir (Şekil 2.17-24). Türkiye Florası kayıtlarına göre bu bitki yoğun olarak 50-1000 metre yükseklikte, gölgeli nehir yataklarında, gölgeli habitatlarda ve kayın ormanlarında yetişir. Çiçekli bir bitki olmasına rağmen rizomlarla çoğalır. Az ışık alan ortamlarda yetiştiğinden yeterli tohum üretmez [120]. Mart-mayıs ayları arasında çiçek açar. *Trachystemon orientalis*'in çiçekleri, sapları, yaprakları ve rizomları besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Anadolu'da genç sürgünlerinden ve yaprak saplarından turşu yapılmakta ve sebze olarak kullanılmaktadır [116,117]. Yerel isimlerinden bazıları; hodan, galdirek, kaldırık ve kalduruk (Bolu); burğı (Artvin); tamara (Trabzon); ve zılbit (Karadeniz Ereğlisi, Zonguldak) [118], balıkotu, acı hodan, doğu hodanı'dır [119].

Bitki, tanen, uçucu yağ, nitrat tuzları, müsilaj, saponin ve rezin taşımaktadır. İdrar arttırıcı, yumuşatıcı ve ateş düşürücü etkilere sahiptir. Halk arasında kan temizleyici olarak bilinir. Dahilen infüzyon halinde kullanıldığı gibi ilkbaharda çiçek tomurcuklu ve yapraklı gövdeleri sebze olarak da tüketilmektedir [118]. Çiçekli gövde ve dip kökleri ile beraber henüz taze iken toplanır. Yapraklarının genç ve yeşil olanlarından Karadeniz bölgesinde sulu yemek yapılır. Soğanla kavrulur veya dolma olarak tüketilir. Börek içi olarak kullanılır. Haşlanıp suyu hafif sıkıldıktan sonra yumurta ile kavrulur [115, 120]. Diğer bir şekli ise üzerine sarımsaklı sos yaparak yenilebilir.

Orientalis tohumları yüksek oranda γ -linolenik asit (GLA) içermektedir [121]. Doğada bazı bitki, mantar ve mikroorganizmalarda bulunan GLA sağlık açısından önemli bir maddedir. GLA'nın kullanım alanları içinde bebek mamaları, atropik egzema, diabetik nöropati, romatoid artrit, yüksek tansiyon ve genel enfeksiyonlar bulunmaktadır [121].

Orientalis'in sitotoksik olmayan konsantrasyonda (40 µg/ml) parainfluenza virus plak oluşumunu % 50 oranında inhibe ettiği ortaya konmuştur [119]. *Orientalis*'in etanollü ekstresinin *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğu da saptanmıştır [122].

Halk arasında 'ısırgan' (*Urtica dioica*), 'böğürtlen' (*Rubus sanctus*), 'merocan' (*Smilax excelsa*) ve 'kaldirik' (*Trachystemon orientalis*)'tan hazırlanan çay karışımı kaynatılarak, meme kanseri, mide ağrısı ve gaz tedavisi için kullanılır [123].

Çalışmamızda Karadeniz Bölgesi'nde ve İstanbul'da sebze olarak tüketilen ısıptın antioksidan etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.



Şekil 2.17: Isiptın çeşitli görünümüleri [124]



Şekil 2.18: Isıtın çeşitli görünümleri [125]



Şekil 2.19: Isıtın çeşitli görünümleri [126]



Şekil 2.20: Isıtın çeşitli görünümüleri [127]



Şekil 2.21: Isıtın çeşitli görünümüleri [128]



Şekil 2.22: Ispıtın çeşitli görünümleri [129]



Şekil 2.23: Ispıtın çeşitli görünümüleri [130]



Şekil 2.24: Ispitın çeşitli görünümüleri [131]

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER

Buzdolabı	: Arçelik
Destile Su Cihazı	: Brand MonoDest 3000
Derin Dondurucu	: Beko
Etüv	: Nüve FN500
Rota Evaporatör	: Bibby Rotary Vacum Evaporator
Fırın	: Heraus
pH Metre	: Backman pH Meter H5
Santrifüj Cihazı	: Denley BS400
Spektrofotometre	: Shimadzu UV Visible UV-120-02, Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu UV mini-1240 Spectrophotometer
Sonikatör	: Bandelin Sonarex
Su Banyosu	: Bibby Waterbath RE100B, Nüve BM 101, Clifton, Memmert
Terazi	: Mettler 110 Hassas Terazi, 1Gec Avery Terazi
Vorteks	: Fisons Whirlimixer

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

İspıtın etil asetat ve etil alkollü ekstrilerinin hazırlanmasında etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$; Merck 109623) ve etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; %96'lık) gibi çözücüler kullanıldı.

Ekstrelerin total fenolik bileşik miktarlarının tayininde, sodyum tungstat (Na_2WO_4 ; Merck 106673), sodyum molibdat (Na_2MoO_4 ; Merck 386021), fosfat asidi (H_3PO_4 ; Merck 100563), hidroklorik asid (HCl ; Merck 100314) ve lityum sülfat ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Fluka 62609), brom (Br_2 ; Merck 1945) kullanılarak Folin reaktifi hazırlandı. Hazırlanan Folin reaktifi ile sodyum karbonat (Na_2CO_3 ; Merck 106398) kullanılarak ekstrilerin fenolik bileşik miktarları tayin edildi. Standart olarak pirokateşol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$; Fluka 15880) kullanıldı.

Total flavonoid miktarının tayininde ise, sodyum nitrit (NaNO_2 ; Merck 6544), alüminyum klorür (AlCl_3 ; Merck 1064) ve sodyum hidroksit (NaOH ; Merck 6462)'den yararlanıldı. Standart olarak kateşin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$; Sigma C1251) kullanıldı

Prolin miktar tayininde ise sülfosalisilik asid ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Merck 690), ninhidrin (2,2-dihidroksiindan-1,3-dion; Merck 6762), glasiyel asetik asid (CH_3COOH ; Merck 100056), fosfat asidi (H_3PO_4 ; Merck 100563) ve toluen (C_7H_8 ; Merck 8323) kullanıldı. Standart olarak prolin ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$; Merck 107434) kullanıldı.

E vitamini miktar tayininde ise, 2-2'-dipiridil ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{S}_4$; Fluka 11557), demir-3-klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Merck 3948), kloroform (CHCl_3 ; Merck 10244), α -tokoferol ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$; Merck 8283) standart olarak kullanıldı.

İndirgeyici güç miktar tayininde, sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 106345) ve sodyum monohidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 106573)'tan fosfat tamponu hazırlandı. Deneyde potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; Riedel de Hæn 12643), triklor asetik asid (TCA; Merck 100807), demir-3- klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Merck 3948) ve standart olarak α -tokoferol ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$; Merck 8283) kullanıldı.

DPPH radikal giderme aktivitesi deneyinde ise 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH; Sigma D9132) ve metanol (CH_3OH ; 106018) kullanıldı. Standart olarak BHA ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$; Sigma B1253) Troloks (6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asid; Aldrich 23,881-3), askorbik asid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; Merck 100127), rutin ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}$; Sigma R5143) ve kuersetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Fluka 83370) kullanıldı.

Hidroksi radikal giderme aktivitesi deneyinde ise sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 106345) ve sodyum monohidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 106573) kullanılarak fosfat tamponu hazırlandı. 2-Deoksiriboz (Fluka 31170), demir-II-sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Riedel de Hæn 351859), etilendiamin tetra asetik asid (EDTA; Merck 8421), hidrojen peroksit (H_2O_2 ; Merck 108600), trikloroasetik asid, (TCA; Merck 100807), tiyobarbitürik asid (TBA; Fluka 88481) ve sodyum hidroksit (NaOH ; Merck 6462) kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Standart olarak BHA ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$; Sigma B1253), askorbik asid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; Merck 100127), ve α -tokoferol ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$; Merck 8283) kullanıldı.

ABTS radikal giderme aktivitesi deneyinde ise 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asid) (ABTS; Fluka 11557), metanol (CH_3OH ; Merck 106018), potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; Merck 5090) ve standart olarak Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asid; Aldrich 23,881-3), rutin ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}$; Sigma R5143) ve kuersetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Fluka 83370) kullanıldı.

DMPD radikali giderme aktivitesi deneyinde, N,N-dimetil-1,4-fenilen diamonyum diklorid (DMPD; Merck 103067), demir-3-klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Merck 3946) ve sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Merck 6265) kullanıldı. Standart olarak ise, BHA ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$; Sigma B1253), Troloks (Aldrich 23,881-3) ve askorbik asid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; Merck 100127) kullanıldı.

Metal kelatlama aktivite tayininde ise demir II klorür (FeCl_2 ; Merck 3860) ve ferrozin (3-(2-piridil)5,6-difenil-1,2,4-triazin-4'4''-disülfonik asid monosodyum tuzu; Fluka 82950) kullanılarak deneyler yapıldı. Standart olarak Troloks (Aldrich 23,881-3), BHT

(C₁₅H₂₄O; Fluka 34750), BHA (C₁₁H₁₆O₂; Sigma B1253), ve α -tokoferol (C₂₉H₅₀O₂; Merck 8283) kullanıldı.

H₂O₂ radikal giderme aktivite deneyinde sodyum monohidrojen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O; Merck 106573) ve sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄; Merck 106345) ve hidrojen peroksit (H₂O₂; Merck 108600) kullanıldı.

Lipid peroksidasyonuna karşı inhibisyon aktivitesi deneyinde demir-3-klorür (FeCl₃.6H₂O, Merck 3946), askorbik asit (C₆H₈O₆; Merck 100127), trikloroasetik asit (TCA, Merck 100807), tiyobarbutirik asit (TBA, Fluka 88481), hidroklorik asit (HCl; Merck 100314), BHT (Fluka 34750), 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP; Sigma T9889), n-butanol (CH₃(CH₂)₃OH; 100988) kullanıldı.

Demir iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli (FRAP) deneyinde, 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ; Merck 110238), hidroklorik asit (HCl; Merck 100314), demir-3-klorür (FeCl₃.6H₂O, Merck 3946), sodyum asetat (CH₃COONa.3H₂O; Merck 6265), glasiyel asetik asit (CH₃COOH; Merck 100056) ve demir-II-sülfat (FeSO₄.7H₂O; Merck 3965) ile deneyler yapıldı. Askorbik asit (C₆H₈O₆; Merck 100127), ve α -tokoferol (C₂₉H₅₀O₂; Merck 8283) standart olarak kullanıldı.

3.3. BİTKİ MATERYALİ

Çalışmamızda kurutulmuş ısıt yaprak ve kök kısımlarından sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstratlar hazırlandı. Karadeniz Bölgesinden Nisan ayında temin edilen ısıt (*Trachystemon orientalis* (L.) G. Don) örnekleri temizlenip destile su ile yıkandı. Kurulandıktan sonra küçük parçalara ayrıldı ve gölgede kurutuldu. Isıtın türünün teşhisi Eczacılık Fakültesi emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kerim ALPINAR tarafından yapıldı.

3.3.1. Sulu Ekstrenin Hazırlanması

Sulu ekstre hazırlamak için 40 g bitki balona konularak üzerine 400 mL destile su ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında ısıtıcı ile 2 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım, soğutulduktan sonra süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü önceden darası alınan balona alındı. Balon, rota evaporatöre yerleştirildi ve karışımın suyu düşük basınç altında uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre miktarı 315.45 mg/g bitki olarak bulundu. Ekstre daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.3.2. Etil Alkollü Ekstrenin Hazırlanması

Etil alkollü ekstre hazırlamak için, 40 g bitki Sokslet cihazının kartuşuna konuldu. Kartuş Sokslet Sistemine yerleştirilerek cihazın balonuna 250 mL % 96'lık etil alkol konularak karışım geri soğutucu altında 4-5 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım soğutulduktan sonra süzgeç kağıdından süzülerek, önceden darası alınan balona konuldu. Balon rota evaporatöre yerleştirilerek düşük basınç altında etil alkol karışımdan uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre miktarı 69.38 mg/g bitki olarak bulundu. Ekstre daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.3.3. Etil Asetatlı Ekstrenin Hazırlanması

Etil asetatlı ekstre hazırlamak için, 20 g bitki Sokslet cihazının kartuşuna konuldu. Kartuş Sokslet Sistemine yerleştirilerek cihazın balonuna 250 mL etil asetat konularak karışım 4-5 saat geri soğutucu altında reflüks edildi. Elde edilen karışım soğutulduktan sonra süzgeç kağıdından süzülerek, önceden darası alınan balona konuldu. Balon rota evaporatöre yerleştirilerek düşük basınç altında etil asetat karışımdan uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre miktarı 10.40 mg/g bitki olarak bulundu. Ekstre daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

Çalışmamızda hazırlanan tüm ekstrelerin UV-görünür absorpsiyon spektrofotometresinde spektrumları alındı.

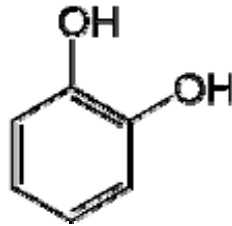
3.4. ANTIÖKSİDAN AKTİVİTE DENEYLERİ

3.4.1. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini

Ekstrelerdeki toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi ile Slinkard ve Singleton'un metoduna göre tayin edildi [132]. CuSO_4 alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks oluşturur. Folin reaktifi ilave edildiğinde Folin reaktifi protein ile bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu (II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu (I) molibdotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve renk sarıdan maviye dönüşür.

Deneyleerde standart fenolik bileşik olarak pirokateşol kullanıldı (Şekil 3.1). Standart grafik çizmek amacıyla 25 mg pirokateşol 25 mL destile suda çözülerek (1 mg/mL) stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 25, 50, 75 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltiler hazırlandı. Bu standart çözeltilerden tüplere 0.1 mL konuldu. Tüplere 4.5 mL destile su ilave edildikten sonra sonra sıra ile 0.1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 3 dakika sonra % 2'lik Na_2CO_3 çözeltilisinden 0.3 mL ilave edildi. Tüpler vortekste karıştırıldı ve karışım 2 saat boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Numuneler ve kör benzer şekilde hazırlandı. Köre standart çözelti ve numune yerine 0.1 mL destile su konuldu. Aynı işlemler yapıldı.

Daha sonra standardın ve numunelerin absorbansı 760 nm'de köre karşı okundu. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen pirokateşol miktarı standart eğri yardımıyla hesaplandı ve sonuçlar pirokateşol ekivalenti şeklinde ifade edildi.

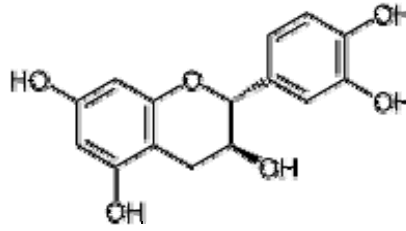


Şekil 3.1. Pirokateşolün kimyasal yapısı

3.4.2. Total Flavonoid Miktar Tayini

Bitki ekstrlerinde total flavonoid miktarı Zhishen, Mengcheng, Jianming metoduna göre tayin edildi [133].

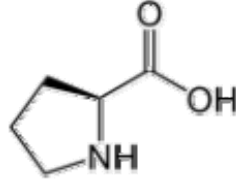
0.25 mL bitki ekstresi (100 µg-400 µg/mL) alındı. Üzerine 1.25 mL destile su ve 75 µL % 5 NaNO₂ ilave edildikten sonra 6 dakika oda temperaturünde bekletildi. Üzerine 150 µL % 10 AlCl₃ çözeltisi ilave edilerek tekrar 5 dakika bekletildi. 0.5 mL 1 M NaOH çözeltisi ve 275 µL destile su ilavesinden sonra tüpler iyice karıştırıldı ve 510 nm'de ayıraç körüne karşı absorbans değerleri okundu. Standart olarak 20-100 µg/mL konsantrasyonlarında kateşin kullanıldı (Şekil 3.2). Ekstrelerin flavonoid miktarı gram ekstrede mg kateşine eşdeğer olarak olacak şekilde ifade edildi.



Şekil 3.2. Kateşinin kimyasal yapısı

3.4.3. Prolin Tayini

50 mg bitki ekstresi üzerine 10 mL sülfosalisilik asid (% 3 w/v) ilave edilerek homojenize edildi. Süzüldü, süzüntüden 2 mL alındı. Üzerine 2 mL asid ninhidrin çözeltisi (1.25 g ninhidrin + 30 mL glasiyel asetik asid + 20 mL 6 M H₃PO₄) ve 2 mL glasiyel asetik asid ilave edilerek 100°C'de 1 saat bekletildi. Üzerine 4 mL toluen ilave edilerek 15-20 sn vortekste karıştırıldı. Toluen fazı ayrıldı ve 520 nm'de toluen'e karşı spektrofotometrede absorbans değeri okundu. Standart olarak prolin kullanılarak çizilen eğri yardımıyla prolin miktarı hesaplandı [134] (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Prolinin kimyasal yapısı

3.4.4. E Vitamini Miktar Tayini

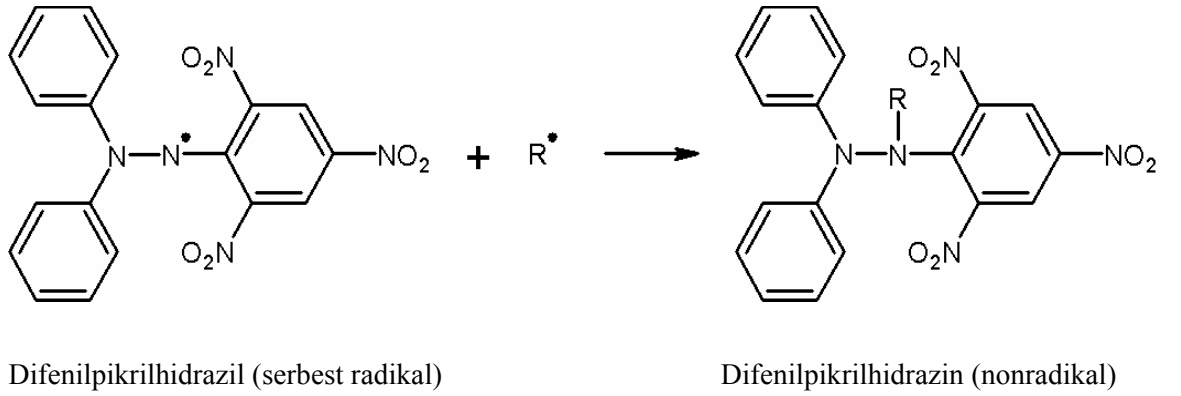
E vitamini miktar tayini Deacon ve Wamble metoduna göre tayin edildi [135]. 0.5 mg, 1 mg, 2 mg ve 3 mg olacak şekilde ekstreler tartıldı. Üzerine 8 mL CHCl_3 , 1 mL % 0.5'lik 2,2'-dipiridil (mutlak alkolde) ve 1 mL % 0.2'lik FeCl_3 eklendi. Kör için 8 mL CHCl_3 , % 0.5'lik 2,2'-dipiridil (mutlak alkolde) ve 1 mL % 0.2'lik FeCl_3 kullanıldı. Karıştırıldı ve numunelerin absorbansı 522 nm'de köre karşı okundu. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen α -tokoferol miktarı standard eğri yardımıyla hesaplandı.

3.4.5. İndirgeme Gücü

Ekstrelerin indirgenme gücü tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı [136]. 100-500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standart (α -tokoferol) ve bitki ekstresi çözeltileri hazırlandı. Üzerlerine pH: 6.6 olan 0.2 M fosfat tamponundan 2.5 mL ilave edildi. Daha sonra % 1'lik $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 'den 2.5 mL ilave edilerek karışım su banyosunda 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemde sonra reaksiyon karışımlarına 2.5 mL % 10'luk trikloroasetikasid (TCA) ilave edildi. Tüpler karıştırıldı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Çözeltinin üst fazından 2.5 mL alındı. Üzerine 2.5 mL destile su ve 0.5 mL % 0.1'lik FeCl_3 ilave edildi. 10 dakika bekletildi. Spektrofotometrede 700 nm'de ayıraç körüne karşı absorbans değeri ölçüldü. Körün hazırlanmasında 5 mL destile su alındı. Üzerine 2.5 mL FeCl_3 ilave edildi. Ekstrenin ve standardın indirgeme güçleri konsantrasyon (100-500 $\mu\text{g/mL}$) ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbanslar arasında çizildi.

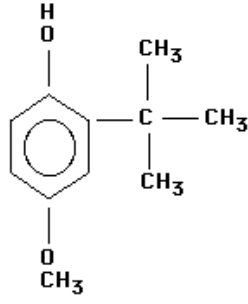
3.4.6. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi

Serbest radikal giderme aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen metoda göre 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi [55, 56]. DPPH, bir serbest radikaldir (Şekil 3.4) ve bir elektron veya hidrojen radikali ile etkileşerek stabil diyamagnetik bir molekül olma eğilimindedir [62, 63].

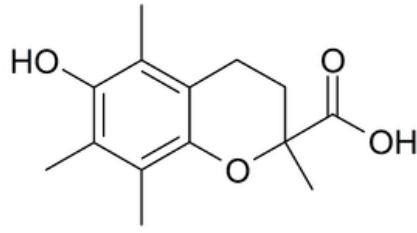


Şekil 3.4. DPPH radikalının indirgenmesi [137]

DPPH'in metanoldeki 20 mg/L'lik çözeltisi günlük olarak hazırlandı. Bundan 1.5 mL alınarak üzerine farklı konsantrasyonlarda (20-100 µg/mL) hazırlanan bitki ekstratlarından 0.75 mL ilave edildi. Standart olarak BHA (Şekil 3.5), Troloks (Şekil 3.6), askorbik asid (Şekil 3.7), rutin (Şekil 3.8) ve kuersetin (Şekil 3.9) kullanıldı. 5., 10., 30. ve 60. dakikalarda köre karşı absorbans değeri 517 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Kontrol olarak 0.75 mL metanol, 1.5 mL DPPH çözeltisi kullanıldı. Kör olarak sadece metanol kullanıldı. Azalan absorbans değeri geriye kalan DPPH çözelti miktarını yani DPPH radikal giderme aktivitesini verir.



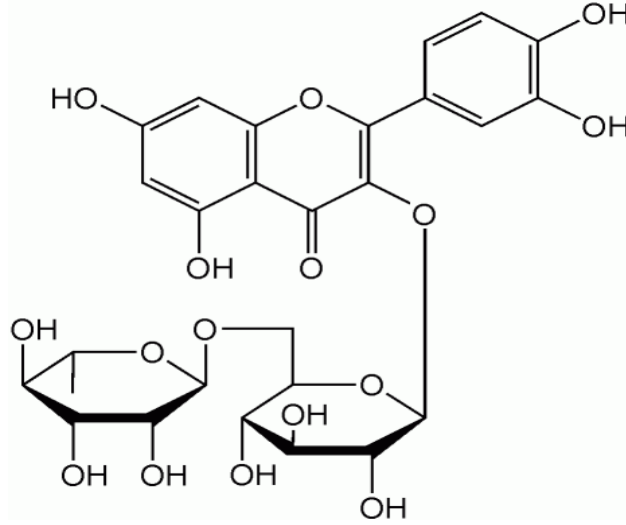
Şekil 3.5. BHA molekülünün kimyasal yapısı



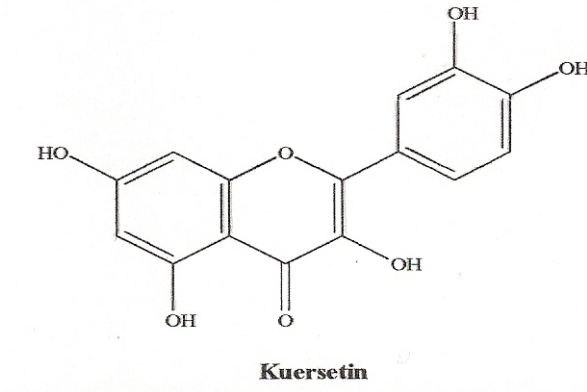
Şekil 3.6. Troloksun kimyasal yapısı



Şekil 3.7 Askorbik asidin kimyasal yapısı



Şekil 3.8. Rutinin kimyasal yapısı



Şekil 3.9. Kuersetinin kimyasal yapısı

DPPH radikal giderme aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı:

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

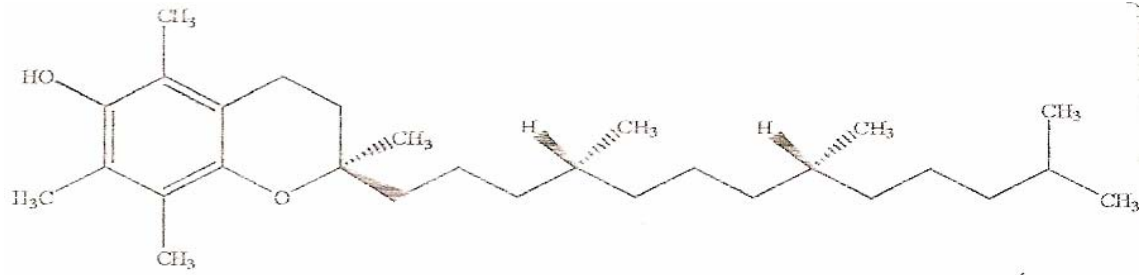
A_0 =Kontrol absorbans değeri

A_1 =Örnek ve standardın absorbans değeri

3.4.7. Hidroksi Radikal Giderme Aktivitesi

Hidroksi radikal giderme aktivitesi deoksiriboz metoduna göre yapıldı [138]. 450 μL 0.2 M sodyum fosfat (pH: 7.0), 150 μL 10 mM 2-deoksiriboz, 150 μL 10 mM FeSO_4^-

EDTA, 525 µL bidestile su ve 75 µL örnek numune çözeltisinden ibaret olan reaksiyon karışımına ilave edildi. Reaksiyon 150 µL 10 mM H₂O₂ ilavesi ile başlatıldı. 37°C'de 4 saat inkübasyondan sonra 750 µL % 2.8'lik TCA ve 50 mM NaOH'deki %1'lik TBA çözeltisinden 750 µL ilave edildi ve 10 dakika kaynatıldı. Tüpler soğutularak 520 nm'de absorbans değerleri okundu. Numune içermeyen reaksiyon karışımı kontrol olarak kullanıldı. Standart olarak BHA (25-100 µg/mL), askorbik asid (25-100 µg/mL) ve α-tokoferol (25-100 µg/mL) (Şekil 3.10) kullanıldı.



Şekil 3.10. α-Tokoferolün kimyasal yapısı

Hidroksi radikal giderme aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı:

$$\text{Hidroksi Radikal Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀=Kontrol absorbans değeri

A₁=Örnek ve standardın absorbans değeri

3.4.8. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi

ABTS radikal giderme aktivitesi deneyi, antioksidanların dayanıklı bir radikal katyonu olan ABTS radikalini giderme aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanır (Şekil 3.11).

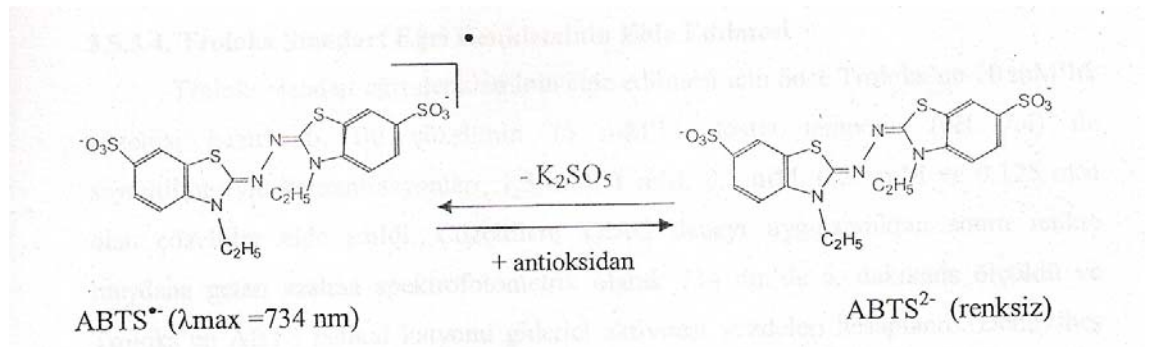
1 mL destile suda 7.4 mM ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid) çözülerek üzerine 1 mL 2.6 mM potasyum persülfat eklendi. Oda sıcaklığında 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Bu karışımdan 1 mL alındı. Üzerine 60 mL metanol ilave edildi. Bu çözeltinin absorbansı 734 nm'de spektrofotometrede metanole karşı okundu. ABTS radikal katyonunun 734 nm'deki absorbansı 0.7 ± 0.02'dir. Her deney için bu

karışım taze olarak hazırlandı. Hazırlanan metanollü ABTS çözeltisinden 2850 µL alındı. Üzerine 150 µL bitki ekstresi konuldu. 2 saat karanlıkta bekletildi. Spektrofotometrede 734 nm’de absorbans değeri okundu. Standart olarak Trolox (500-2500 µg/mL), rutin (500-2500 µg/mL) ve kuersetin (500-2500 µg/mL) kullanıldı. Kontrol olarak numune yerine metanol içeren reaksiyon karışımı kullanıldı. % ABTS radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı [139].

$$\text{ABTS radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_0 =Kontrol absorbans değeri

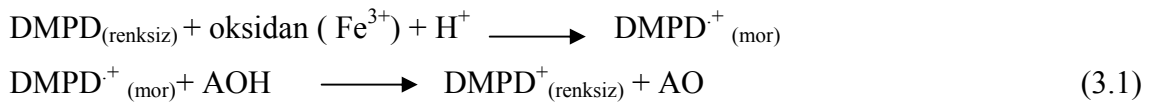
A_1 =Örnek ve standardın absorbans değeri



Şekil 3.11: 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid) amonyum tuzunun persülfatla oksidasyonu sonucu $\text{ABTS}^{\bullet+}$ meydana gelişi [137]

3.4.9. DMPD Radikal Giderme Aktivitesi

DMPD radikal giderme aktivitesi temeli, asidik pH ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında DMPD'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu oluşturması esasına dayanır. DMPD radikali 505 nm’de maksimum absorbans değeri gösterir. DMPD’ye bir H atomu transfer edebilen antioksidanlar rengi giderir ve solüsyonda bir renksizleşme meydana gelir.



DMPD radikali giderme aktivitesi Fogliano'nun [140] metoduna göre yapıldı. 209 mg DMPD radikali 10 mL bidestile suda çözüldü. Bu çözültiden 1 mL alınarak 0.1 M pH: 5.3 olan Na-asetat tamponunun 100 mL'sine ilave edildi. 0.05 M FeCl₃ çözültisinden 0.2 mL ilave edilmesiyle renkli DMPD radikal katyonu elde edildi. Bu karışım stabilitesini ancak 12 saate kadar koruduğundan günlük hazırlandı. Karışımın ilk hazırlandığı andaki absorbanı 0.9 ± 0.1 olmalıdır. Karışımın 1 mL'si 0.5 mL standart ve ekstre çözültilerine ilave edildi. 10 dakika sonra 505 nm'deki absorbanları tampon çözültisine karşı okundu. Standart olarak BHA (25-100 µg/mL), Troloks (25-100 µg/mL) ve askorbik asid (25-100 µg/mL) kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{DMPD radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₁: Numunenin absorbanı

A₀: DMPD başlangıç absorbanı

3.4.10. Metal Kelatlama Aktivitesi

Metal kelatlama aktivitesi lipid peroksidasyonuna sebep olan metalleri tutukladığından dolayı önemlidir. Fenton kimyasında da görüldüğü gibi antioksidan kapasite açısından hidroksi radikallerinin oluşmasına sebep olan Fe²⁺ ve Cu²⁺ gibi metallerin tutuklanması son derece önemlidir [141, 142]. Bu yönden de ekstreler ferrozin ve FeCl₂ çözültileri ile inkübe edilir.

Farklı konsantrasyonlarda (2,5-10 µg/mL) 1 mL ekstre alındı. Üzerine 3.7 mL bidestile su ve 2 mM FeCl₂'den 0.1 mL ilave edildi. Karışım 5, 10, 30 ve 60 dakika karanlıkta bekletildi. Reaksiyon 5 mM ferrozinden 0.2 mL ilave edilmesi ile başlatıldı. Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnkubasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbanı bidestile suya karşı okundu. Kontrol olarak 4.7 mL destile su alındı. Üzerine 0.1 mL FeCl₂ ve ferrozin ilave edilerek yukarıda belirtilen şekilde yapıldı. Standart olarak BHA (2.5-10 µg/mL), BHT (2.5-10 µg/mL), Troloks (2.5-10 µg/mL) ve α-tokoferol (2.5-10 µg/mL) kullanıldı.

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

A₀=Kontrol absorban değeri

A_1 =Örnek ve standardın absorbans değeri

3.4.11. H₂O₂ Radikal Giderme Aktivite Tayini

Farklı konsantrasyonlarda (2.5-10 µg/mL) 1 mL bitki ekstresi alındı. Üzerine 2.4 mL 0.1 M pH: 7.4 fosfat tamponu ilave edildi. Üzerine 0.6 mL 43 mM H₂O₂ eklendi. Karanlıkta 60 dakika bekletildi. 230 nm'de köre karşı absorbans okundu. Standart olarak BHA (2.5-10 µg/mL), BHT (2.5-10 µg/mL), α-tokoferol (2.5-10 µg/mL) ve Troloks kullanıldı. (2.5-10 µg/mL) Kör olarak fosfat tamponu kullanıldı. Aşağıdaki formüle göre hesaplama yapıldı [84].

H₂O₂ Radikal Giderme Aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

A_0 =Kontrol absorbans değeri

A_1 =Örnek ve standardın absorbans değeri

3.4.12. Demir (III) – Askorbik Asid ile İndüklenmiş Fosfatidilkolin Lipozomlarının Peroksidasyonu Aktivitesi

Fosfolipidler, gıdalardaki antioksidan bileşiklerin membran lipid peroksidasyonunu inhibe edici aktivite tayininde ideal bir model oluşturur ve fosfolipidler gıdaların potansiyel antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan çok önemli substratlardan biridir [143]. Bu deneyin amacı, ekstrenin lesitinden hazırlanan lipozomlardan oluşturulan suni lipid sisteminin FeCl₃ ve askorbik asid ile inkübasyonu sonucu oluşan peroksid radikallerini giderme kapasitesini ölçmektir. Fosfolipidlerden oluşturulan lipozomlar, askorbik asid ve FeCl₃ varlığında lipid peroksidasyonuna uğrarlar ve biyolojik olarak aktif aldehytler (malondialdehit) oluşur. Malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asidin (TBA) reaksiyona girmesi ile oluşan tiyobarbitürik asid reaktif türlerinin (TBARS) pembe rengi 532 nm'de ölçülerek ekstrenin lipid peroksidasyonuna karşı aktivitesi tayin edilir.

Ekstrenin lipid peroksidasyonuna karşı inhibisyon aktivitesi, Duh ve diğ. geliştirdiği metoda göre tayin edildi [144].

300 mg lesitin 30 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 7.0) ile süspansiyon haline getirildi. Lipozomların açığa çıkması için buz içeren kaptaki her 30 saniyede bir dinlendirilerek toplam 10 dakika sonikatörde muamele edildi ve 10 mg/mL fosfolipid lipozomları içeren bir süspansiyon elde edildi. Deney 3.25 mL'lik reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. İlave edilen maddelerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları parantez içinde gösterildi. Tübe 0.25 mL ekstre (5-25 mg/mL) veya standart olarak kullanılan α -tokoferol (5-25 mg/mL)'e 1 mL 10 mg/mL lipozom süspansiyonu (3.08 mg/mL), 1 mL 400 μ M FeCl₃ (123.2 μ M) ilave edildi ve reaksiyon 1 mL 400 μ M askorbik asid (123.2 μ M) ilavesi ile başlatıldı. Karışım 37°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, TBA metodu ile tayin edildi [97]. 500 μ L reaksiyon karışımına 1000 μ L TCA-TBA ayıracağı (% 15 w/v TCA ve % 0,375 TBA'nın 0.25 N HCl'deki çözeltisi) ve 14 μ L % 2'lik BHT'nin mutlak alkoldeki çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı vortekste karıştırıldı ve 100°C'de 20 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra 1.5 mL n-butanol ilave edildi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Üst kısımdaki organik faz alındı. Meydana gelen pembe rengin absorbansı ölçülerek ekstrenin lipid peroksidasyonu inhibe edici yüzdesi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı :

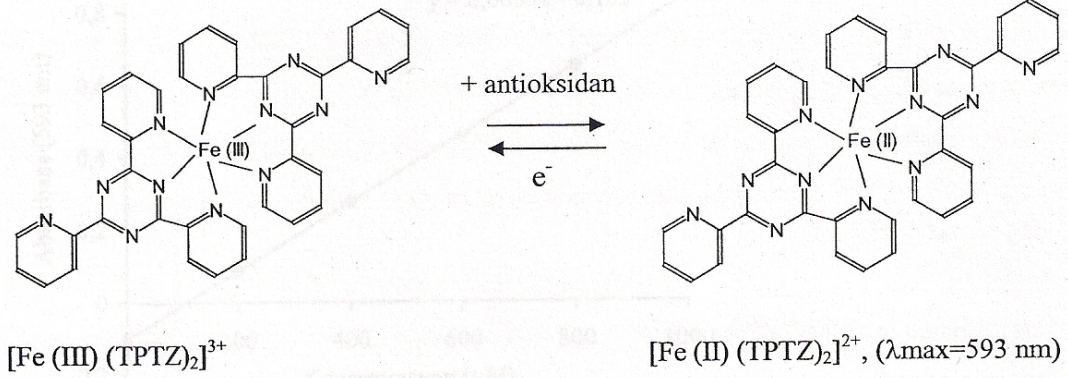
Lipid Peroksidasyona Karşı İnhibisyon Aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

A₀=Kontrol absorbans değeri

A₁=Örnek absorbans değeri

3.4.13. Demir İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi

FRAP deneyinde oksidan olarak Fe (III) tuzları [Fe (III) (TPTZ)₂]³⁺ kullanıldı (Şekil 3.12). [Fe (III) (TPTZ)₂]³⁺ antioksidan tarafından [Fe (II) (TPTZ)₂]²⁺ye indirgenir.



Şekil 3.12: Fe (III) tuzlarının $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$, Fe (II)'ye $[\text{Fe (II) (TPTZ)}_2]^{2+}$ indirgenmesi [137]

FRAP deneyi Benzie ve Strain (1996) metoduna göre yapıldı [145]. FRAP ayırıcı 2.5 mL 10 mM TPTZ'nin 40 mM HCl'deki çözeltisinin 2.5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 25 mL 0.3 M asetat tamponu (pH: 3.6)'nun karıştırılması ile hazırlandı. FRAP ayırıcındaki Fe (III) konsantrasyonu 1.67 mM, TPTZ konsantrasyonu ise 0.83 mM'dır. Her gün taze hazırlanan ve 37°C 'de inkübe edilen FRAP ayırıcının 900 μL 'si, 90 μL destile su ve 30 μL ekstre (2-10 mg/mL) veya standart olarak kullanılan α -tokoferol ve askorbik asid, (kör hazırlanırken destile su) ile karıştırılarak absorbans artışı 4. dakikada 593 nm'de spektrofotometrede ayıraç körüne karşı ölçüldü. Ekstrenin $\Delta A_{593\text{nm}}$ değeri, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200-1000 μM) ile hazırlanan standart eğrisine ait $\Delta A_{593\text{nm}}$ değerlerle karşılaştırmak suretiyle FRAP değeri (mM/L Fe^{2+}), 1 mM Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgenmesi olarak ifade edildi.

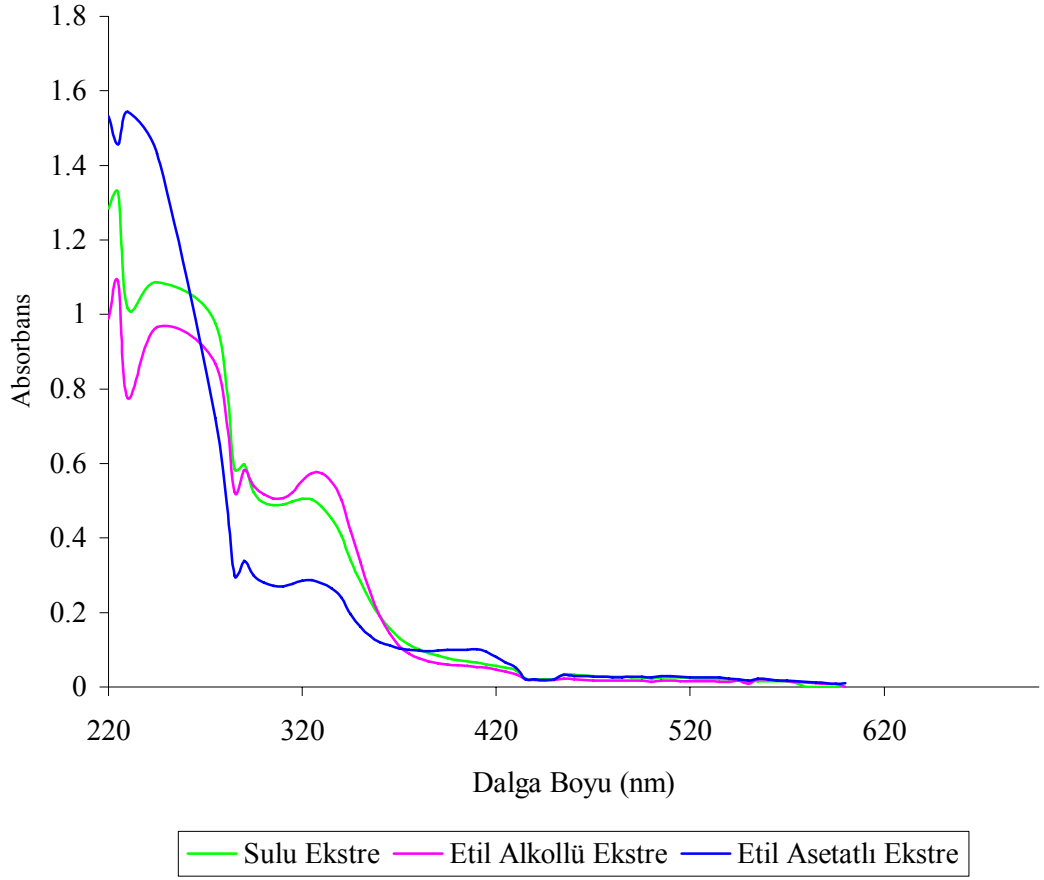
İstatiksel Değerlendirme:

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama \pm SD olarak verildi.

4. BULGULAR

UV-görünür absorpsiyon spektrofotometresi fenolik bileşiklerin yapısal analiz tayinleri için en faydalı yöntemlerden biridir. Fenolik bileşiklerin UV-görünür absorpsiyon spektrofotometresinde gösterdiği 2 maksimum absorpsiyon bandından birinci band 320-380 nm arasında, ikinci band ise 250-285 nm arasındadır [146]. Bütün antosiyaninler ve flavon, flavonal türevleri 250-285 nm arasında spektrum verir. Ispıt bitkisinden hazırlanan sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstreler için UV-görünür spektrumlar Şekil 4.1'de verildi.

Çalışmada bütün ekstrelerde 275 nm'de ve 325 nm'de maksimum absorbans pikleri görüldü. 275 nm'de maksimum absorbans görülmesi ıspıt'da fenolik bileşikler olduğunu göstermektedir. Bitkilerde flavon/flavonol türevlerinin veya antosiyaninin varlığı 220 nm'de bir pik şeklinde görülmektedir. Çalışmada sulu ve etil alkollü ekstrede 225 nm'de, etil asetatlı ekstrede ise 230 nm'de maksimum bir pik görülmektedir. Bu da ekstrelerde flavon/flavonol türevleri ile antosiyaninlerin varlığını göstermektedir.



Şekil 4.1: Ispit bitkisinin sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstreleri için UV-görünür spektrumları

4.1. TOTAL FENOLİK BİLEŞİK MİKTAR TAYİNİ

Total fenolik bileşik miktarı sulu, etil alkollü, etilasetatlı ekstrelerde tayin edildi. Total fenolik bileşik içeriği pirokateşol ekivalenti olarak ifade edildi. Çalışmada en yüksek miktarda fenolik bileşik etil asetatlı ekstrede tespit edildi (Tablo 4.1). Alınan ekstre miktarına bağlı olarak tüm ekstrelerdeki total fenolik bileşik miktarlarında da artış olduğu saptandı (Tablo 4.1). Ekstrelerin total fenolik madde içerikleri sırası ile etil asetatlı>etil alkollü>sulu ekstre'dir. Total fenolik bileşik içeriği 500 µg/mL derişimde etil asetatlı ekstrede en yüksek değerde bulunmuştur.

Tablo 4.1: Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarlarının pirokateşol ekivalenti olarak değerlendirilmesi ($\mu\text{g/mL}$)*

Ekstre Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Sulu Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)	Etil Alkollü Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)	Etil Asetatlı Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)
100	6.70 \pm 0.63	7.46 \pm 0.86	7.18 \pm 1.10
200	10.96 \pm 1.69	11.39 \pm 0.64	8.88 \pm 1.84
300	12.82 \pm 3.13	13.52 \pm 0.96	12.63 \pm 1.36
400	13.86 \pm 0.40	19.50 \pm 2.46	16.56 \pm 2.03
500	17.27 \pm 0.90	21.91 \pm 2.22	25.84 \pm 3.91

*Ortalama \pm SD

4.2. TOTAL FLAVONOİD MİKTAR TAYİNİ

Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstrelerinin total flavonoid miktarları Tablo 4.2’de verildi. Ekstrelerin total flavonoid miktarları $\mu\text{g/mL}$ kateşin eşdeğeri olarak ifade edildi. Ekstrelerin total flavonoid miktarları sırasıyla etil asetatlı>etil alkollü>sulu ekstre şeklinde sıralanmaktadır. Tablo 4.2’ye göre en yüksek flavonoid miktarının etil asetatlı ekstrede olduğu görülmektedir. Ekstrelerin konsantrasyonuna bağlı olarak flavonoid miktarı da artmaktadır. Sulu ekstrede diğer ekstreler göre total fenolik madde içeriğinde olduğu gibi total flavonoid madde içeriğinin de düşük miktarda olduğu görülmektedir.

Total flavonoid miktarı ile fenolik bileşikler arasında bir yüksek korelasyon bulunmaktadır. Bu değerler sulu ekstrede ($r^2=0.9446$), etil alkollü ekstrede ($r^2= 0.9373$) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.9598$) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2: Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrilerinin total flavonoid miktarlarının kateşin ekivalenti olarak değerlendirilmesi ($\mu\text{g/mL}$) *

Ekstre Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Sulu Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)	Etil Alkollü Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)	Etil Asetatlı Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)
100	12.54 \pm 0.77	14.28 \pm 0.41	17.15 \pm 1.87
200	19.96 \pm 0.67	29.82 \pm 1.14	29.13 \pm 2.37
300	31.80 \pm 0.77	41.65 \pm 1.97	53.29 \pm 2.57
400	38.88 \pm 0.51	47.34 \pm 1.65	59.03 \pm 2.88

*Ortalama \pm SD

4.3. PROLIN TAYİNİ

Prolin amino asidi, son yıllarda bitki stres fizyolojisinde üzerinde en çok çalışılan bileşiklerden birisi olmuştur. Bu bileşğin tuz ve su stresi altındaki bitkilerde önemli oranlarda yükseldiğı ve bu sayede bitki savunma mekanizmasını harekete geçirerek bitkinin strese karşı koyma mekanizmasını desteklediğı görüşü hakimdir [147].

Çalışmamızda ekstrilerdeki prolin miktarları 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde etil asetatlı ekstrede diğer ekstrilere nazaran daha yüksek bir değerdedir. Ancak sulu ve etil alkollü ekstrilerdeki değerler birbirine çok yakın bir değerde bulunmuştur.

Tablo 4.3: Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrilerinin prolin miktarlarının prolin ekivalenti olarak değerlendirilmesi ($\mu\text{g/mL}$) *

Ekstre Miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	Sulu Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)	Etil Alkollü Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)	Etil Asetatlı Ekstre ($\mu\text{g/mL}$)
5	1.77 \pm 0.07	2.18 \pm 0.09	2.34 \pm 0.19
10	4.62 \pm 0.21	4.03 \pm 0.14	4.93 \pm 0.16
25	11.18 \pm 0.42	9.42 \pm 0.18	9.01 \pm 0.30
50	16.42 \pm 0.44	13.57 \pm 0.28	13.84 \pm 0.25
75	19.87 \pm 0.25	17.28 \pm 0.49	17.45 \pm 0.33
100	21.22 \pm 0.15	21.41 \pm 0.40	22.06 \pm 0.31

*Ortalama \pm SD

4.4. E VİTAMİNİ MİKTAR TAYİNİ

Yaptığımız denemelerde etil alkollü ekstrede E vitamini miktarı daha fazla oranda bulundu. Sulu ekstrede E vitamini tespit edilemedi.

Tablo 4.4: Ispıtın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin E vitamini miktarlarının α -tokoferol ekivalenti olarak değerlendirilmesi (mg/mL) *

Ekstre Miktarı (mg/mL)	Etil Alkollü Ekstre (mg/mL)	Etil Asetatlı Ekstre(mg/mL)
0.5	4.29 ± 0.26	3.22 ± 0.19
1	9.11 ± 0.36	6.97 ± 0.31
2	17.43 ± 0.70	11.19 ± 0.32
3	23.77 ± 0.84	17.81 ± 1.41

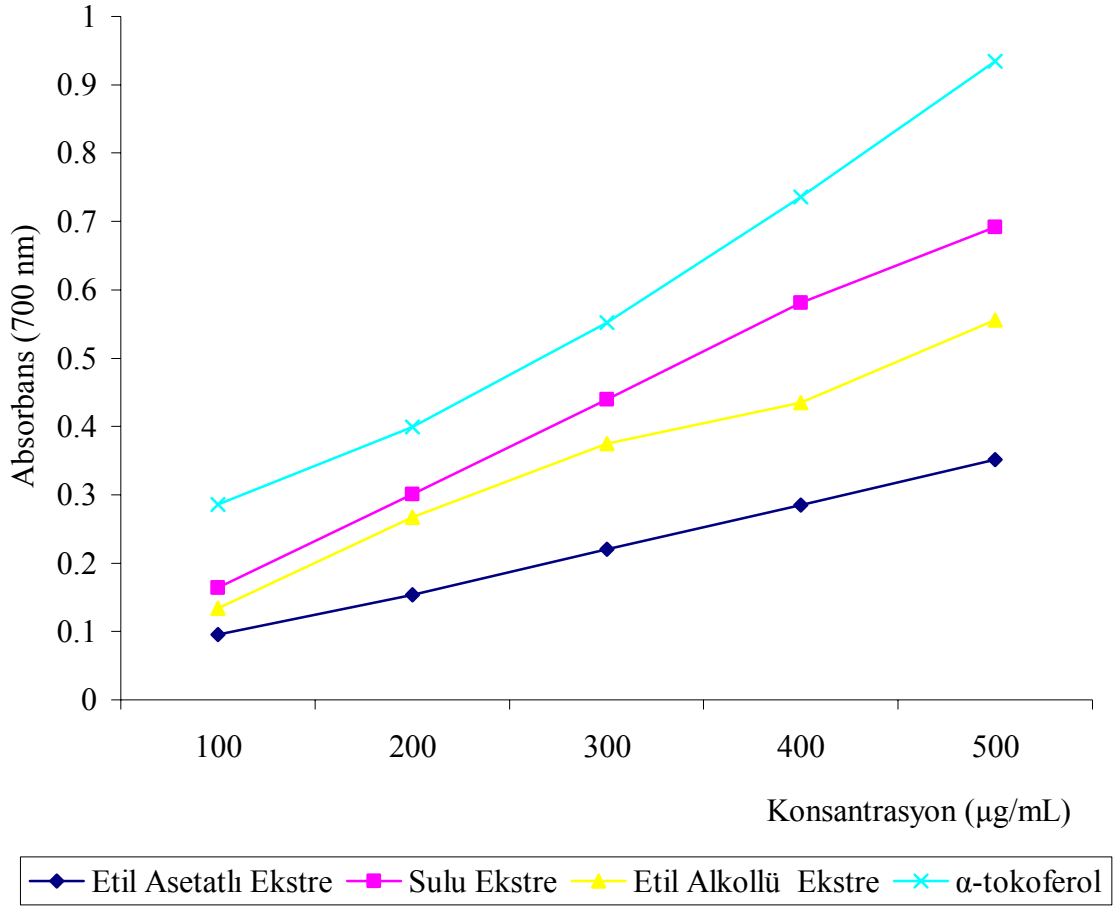
*Ortalama ± SD

4.5. İNDİRGEME GÜCÜ

Çalışmada kullanılan bütün ekstrelerin indirgeme kuvveti Oyaizu metoduna göre Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesine göre yapıldı [136]. Maddelerin indirgeme gücü ile antioksidan aktivite arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Bir bileşik veya ekstrenin indirgenme kapasitesi o bileşik veya ekstrenin antioksidan aktivitesinin önemli bir indikatörü olarak bilinir. Çalışmamızda ıspıt ekstrelerinin indirgeme gücünün ekstre miktarına bağlı olarak arttığı Şekil 4.2'de görülmektedir. En yüksek indirgeme gücüne sulu ekstrenin, en düşük indirgeme gücüne ise etil asetatlı ekstrenin sahip olduğu Şekil 4.2'de gözlenmektedir. Ispıtın total fenolik bileşik ve flavonoid miktarı ile indirgeme gücü arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Sulu ekstrelerde bu değer sırası ile ($r^2=0.9739$, 0.9948), etil alkollü ekstrede ($r^2= 0.9718$, 0.9993) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.9617$, 0.9759) olarak bulunmuştur.

Yapılan birçok araştırmada indirgeme gücü ile total fenolik bileşik arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur [148]. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Bu nedenle bizim çalışmamızda da indirgeme gücü

ile total fenolik bileşik arasında bir ilişki olması antioksidan aktivitenin bu bitkide yüksek değerde olduğunu bize göstermektedir.



Şekil 4.2: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve α-tokoferolün indirgeme güçleri

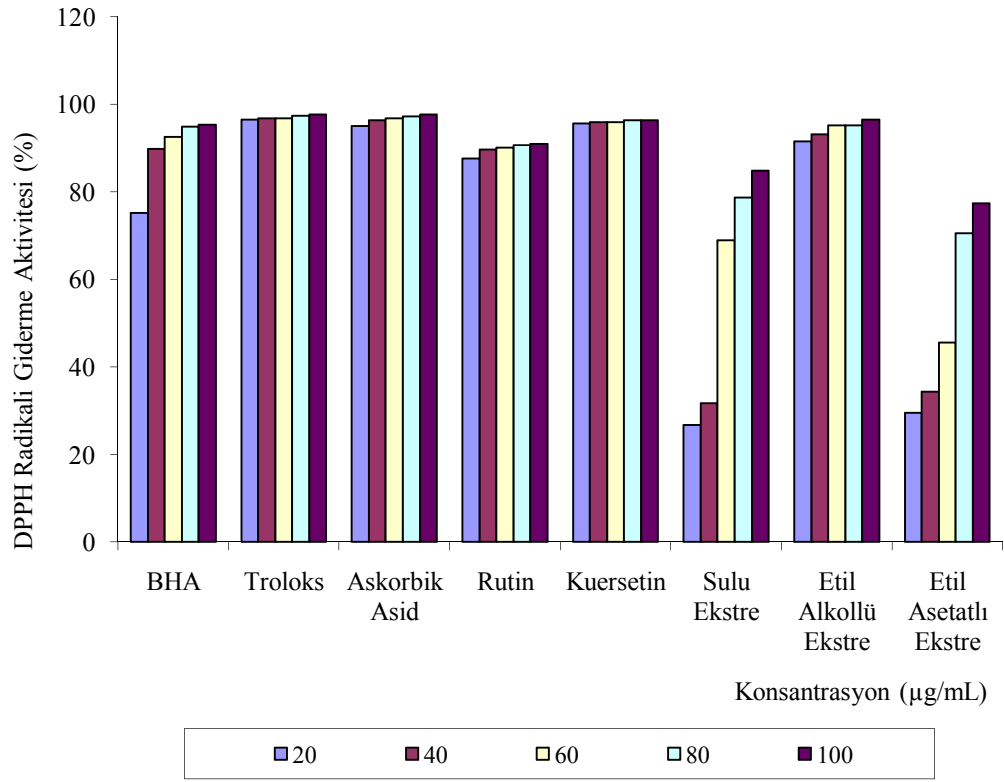
4.6. DPPH RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ

Genel olarak kimyasal maddelerin elektron verme yetenekleri lipid peroksidasyonuna karşı gösterdikleri antioksidan aktivitenin sonucudur. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi hidrojen verme potansiyelinin araştırılması için en kısa ve en ucuz yöntemlerden biridir. DPPH, bir serbest radikaldir. Bir elektron veya hidrojen radikali

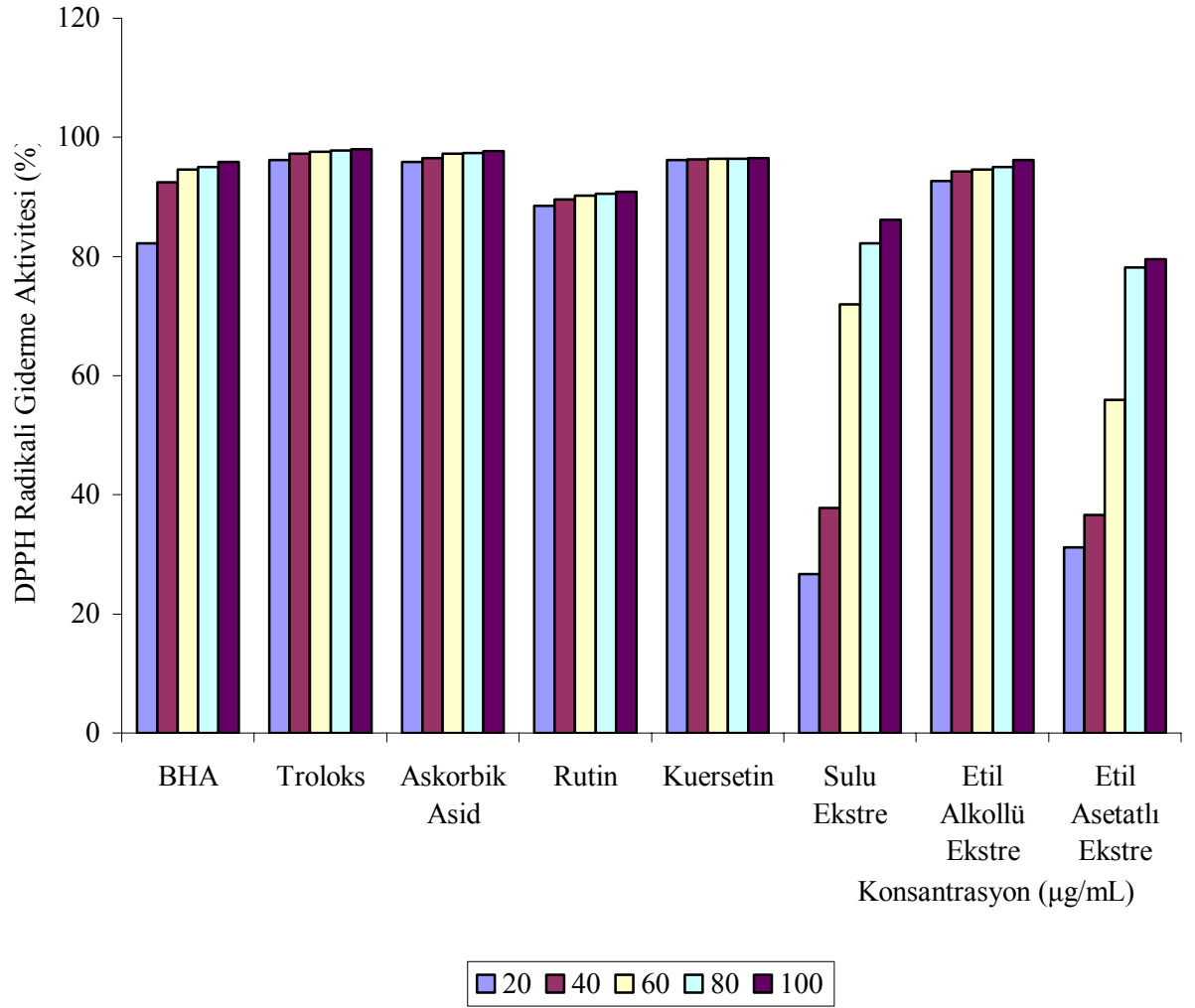
ile etkileşerek stabil diyamagnetik bir molekül olma eğilimindedir [61, 62]. Çalışmada DPPH radikal giderme aktivitesi Şekil 4.3-4.6'da verildi.

Çalışmada sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstrelerin DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon olarak değerlendirildi ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinle serbest radikal giderme aktivite değerleri karşılaştırıldı. Bu değerler Şekil 4.3-4.6'da verildi. DPPH serbest radikal giderme aktivitesinin etil alkollü ekstrede ekstreler arasında en yüksek oranda olduğu görüldü. Test edilen madde konsantrasyonu ile antioksidan aktivitesinin doğru orantılı bir şekilde arttığı görüldü. 5., 10., 30. ve 60. dakikalarda hesaplanan % inhibisyon değerlerinin 60. dakikada en yüksek oranda olduğu görüldü. Ekstrelerin serbest radikal giderme aktivitesi sırasıyla etil alkollü>sulu>etil asetatlı ekstre şeklindedir (Şekil 4.3-4.6).

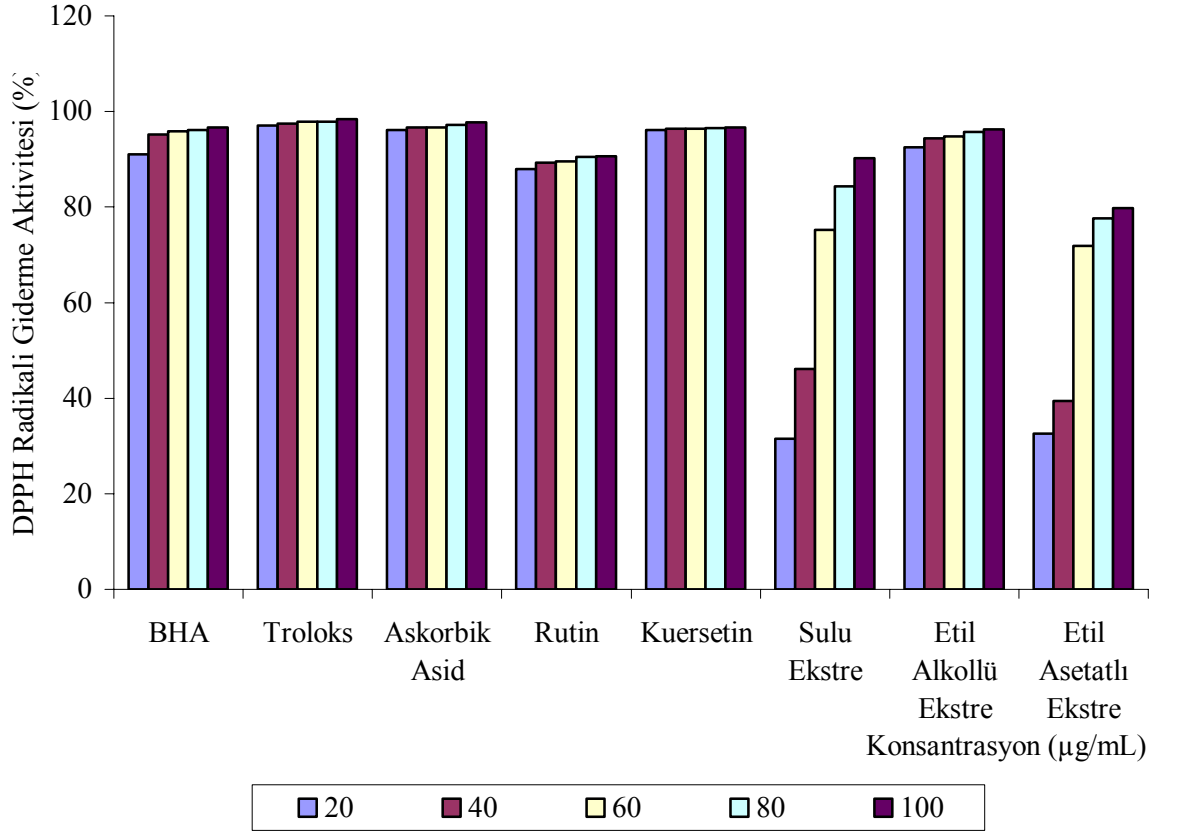
DPPH radikal aktivitesi ile total fenolik bileşik ve flavonoid arasında 60. dakikada sulu ekstrede sırası ile ($r^2=0.9418, 0.9984$), etil alkollü ekstrede ($r^2= 0.9713, 0.9994$) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.8406, 0.9935$) gibi yüksek korelasyon olduğu görülmüştür.



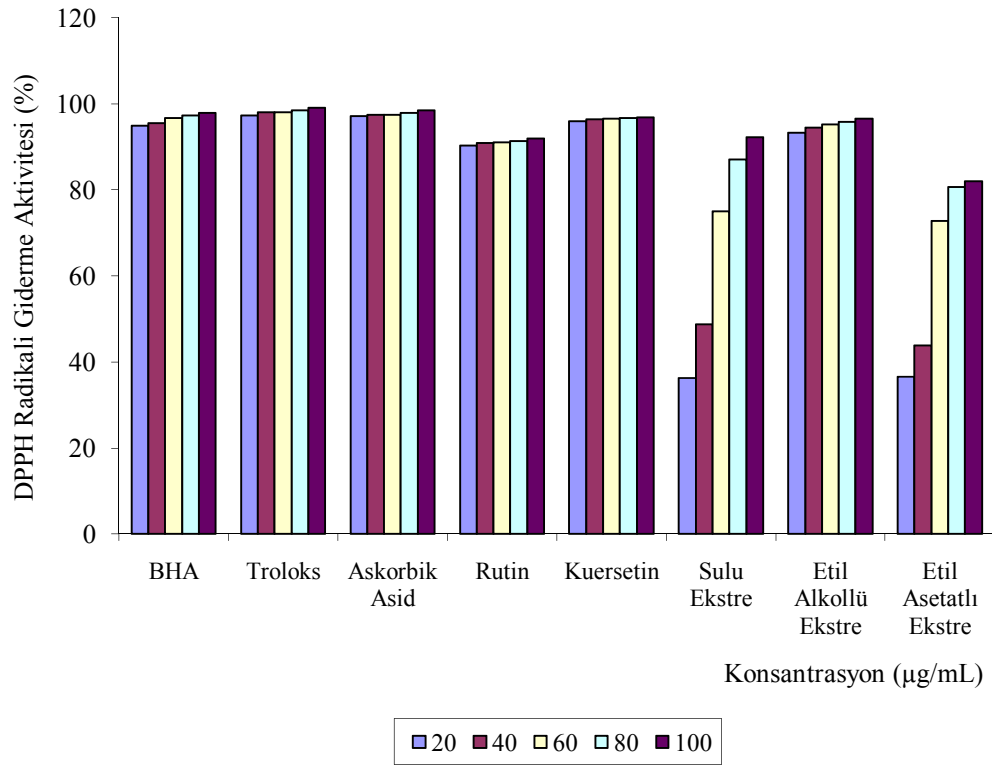
Şekil 4.3: Ispit bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 5. dakikadaki % DPPH radikali giderme aktiviteleri



Şekil 4.4: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 10. dakikadaki % DPPH radikali giderme aktiviteleri



Şekil 4.5: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, Troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 30. dakikadaki % DPPH radikali giderme aktiviteleri



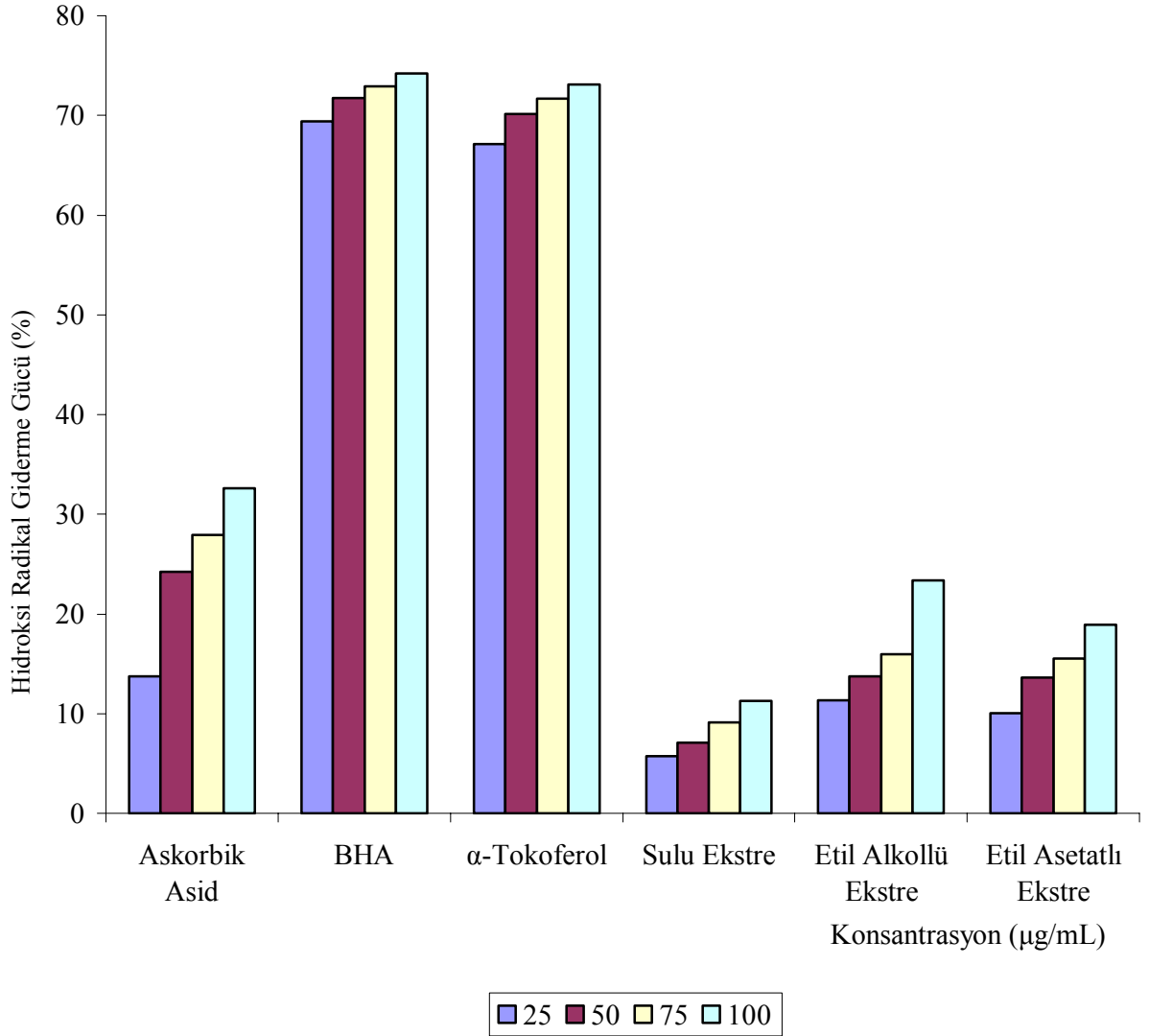
Şekil 4.6: Isprıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve BHA, troloks, askorbik asid, rutin ve kuersetinin 60. dakikadaki % DPPH radikali giderme aktiviteleri

4.7. HİDROKSİ RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ

Standart ve ekstraların hidroksi radikal giderme aktivitelerinin konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı Şekil 4.7’de görülmektedir. Çalışmada hidroksi radikal giderme aktivitesi etil alkollü ekstrede en fazla, sulu ekstrede ise en az değerdedir. Ekstrelerin hidroksi radikal giderme aktivitesi askorbik asid, BHA ve α -tokoferole göre düşük değerdedir.

BHA ve α -tokoferol %70-80’e yakın bir değerde hidroksi radikal giderme aktivitesi gösterdi. Etil alkollü ve etil asetatlı ekstralar ise daha düşük oranda % hidroksi radikal giderme aktivitesi gösterdi. Radikal giderme aktivitesi ile fenolik bileşikler ve flavonoid miktarları arasında sırası ile sulu ekstrede ($r^2=0.9196, 0.9923$), etil alkol ekstresinde

($r^2=0.9869$, 0.8767) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.9726$, 0.9502) yüksek korelasyonlar bulunmuştur.

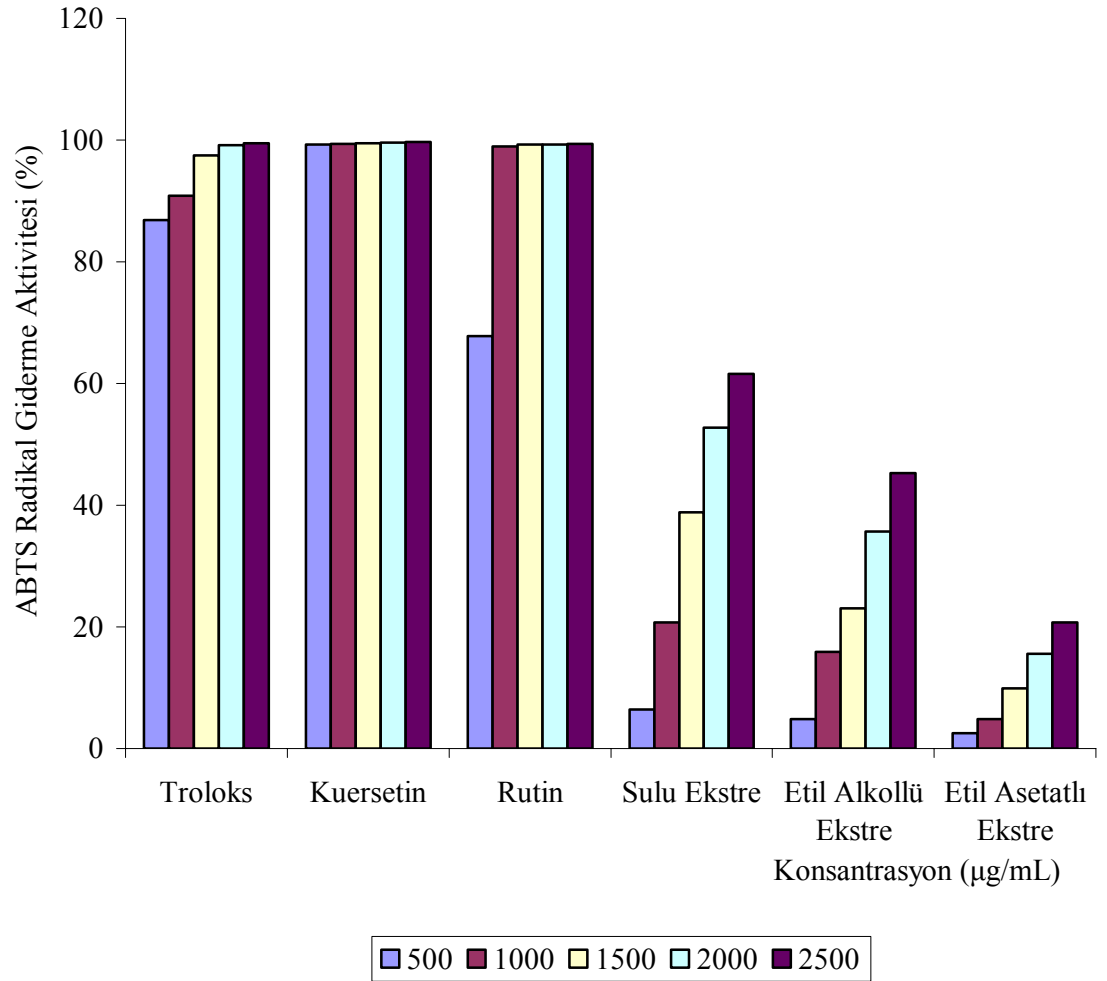


Şekil 4.7: Ispit bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrilerinin ve askorbik asid, BHA ve α-tokoferolün % hidroksi radikal giderme aktiviteleri

4.8. ABTS RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ

Ekstre ve standartların ABTS radikal giderme aktiviteleri Şekil 4.8'de görülmektedir. Çalışmada ABTS radikal giderme aktivitesi sulu ekstrede en fazla, etil asetatlı ekstrede ise en azdır. Ekstrelerin ABTS radikal giderme aktivitesi konsantrasyonla artmaktadır. Standartların ise ekstrele nazaran daha yüksek oranda ABTS radikal

giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. ABTS radikal giderme aktivitesi ile total fenolik bileşik içeriği flavonoid miktarları arasında sulu ekstrede sırasıyla ($r^2=0.9673$, 0.9988), etil alkollü ekstrede ($r^2= 0.9963$, 0.9669) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.9752$, 0.9558) yüksek bir korelasyon bulunmuştur.



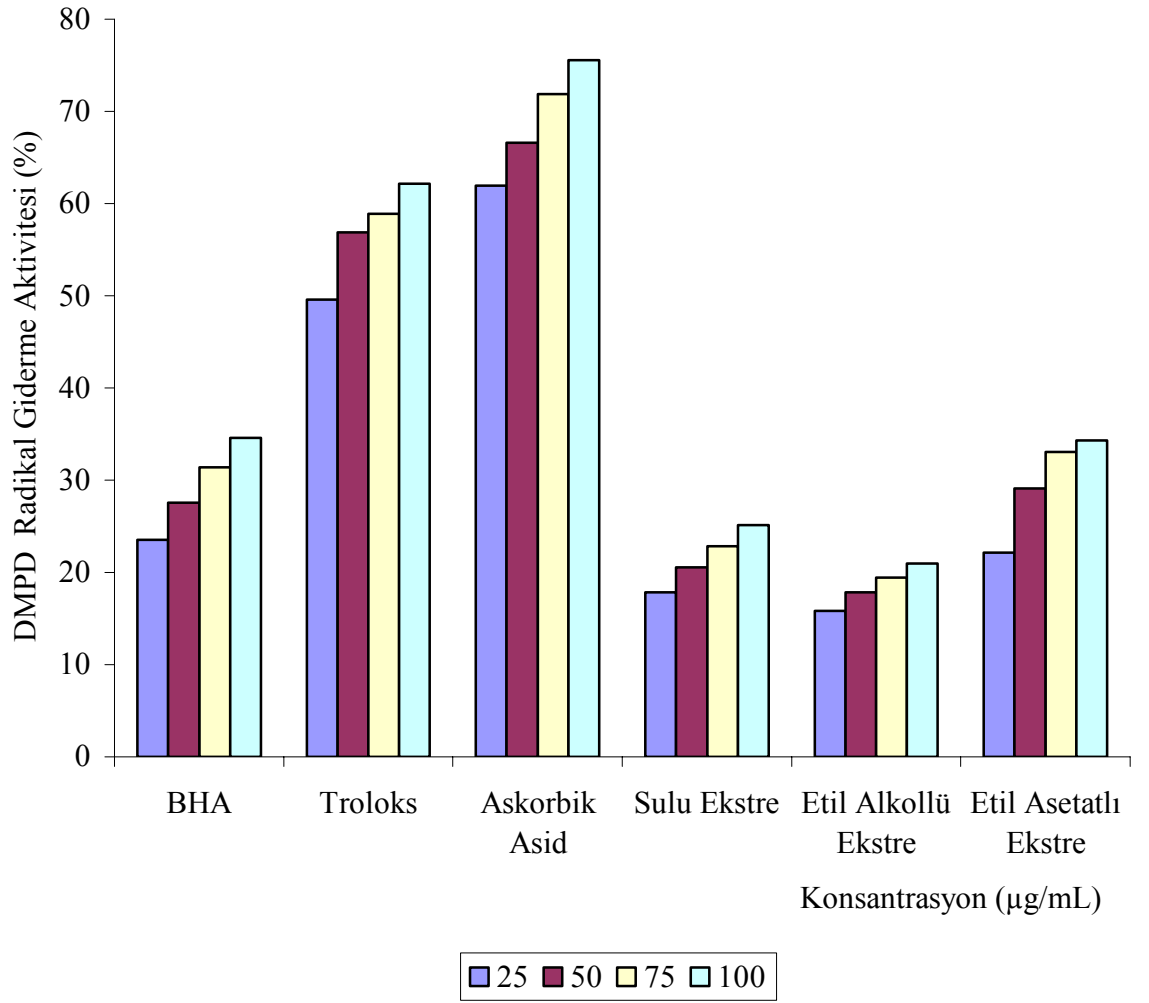
Şekil 4.8: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve Trolox, kuersetin ve rutin % ABTS radikal giderme aktiviteleri

4.9. DMPD RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ

DMPD radikali giderme aktivitesi Şekil 4.9’da görülmektedir. Çalışmada DMPD radikali giderme aktivitesi etil asetatlı ekstrede en fazla, etil alkollü ekstrede ise en azdır. Ekstrelerin DMPD radikali giderme aktiviteleri sırasıyla etil asetatlı>sulu>etil alkollü

ekstre şeklinde sıralanmaktadır. Etil asetatlı ekstrenin BHA'ya yakın değerde bir DMPD aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Ispıtın DMPD radikal ile total fenolik bileşik ve flavonoid miktarları arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Sulu ekstrelerde bu değer sırasıyla ($r^2=0.9651, 0.9929$), etil alkollü ekstrede ($r^2= 0.9748, 0.9911$) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.8933, 0.9564$) olarak gözlenmiştir. Total fenolik bileşik ve flavonoid miktarı ile antioksidan aktivite arasında bir ilişki olması bitkide antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu bize göstermektedir.

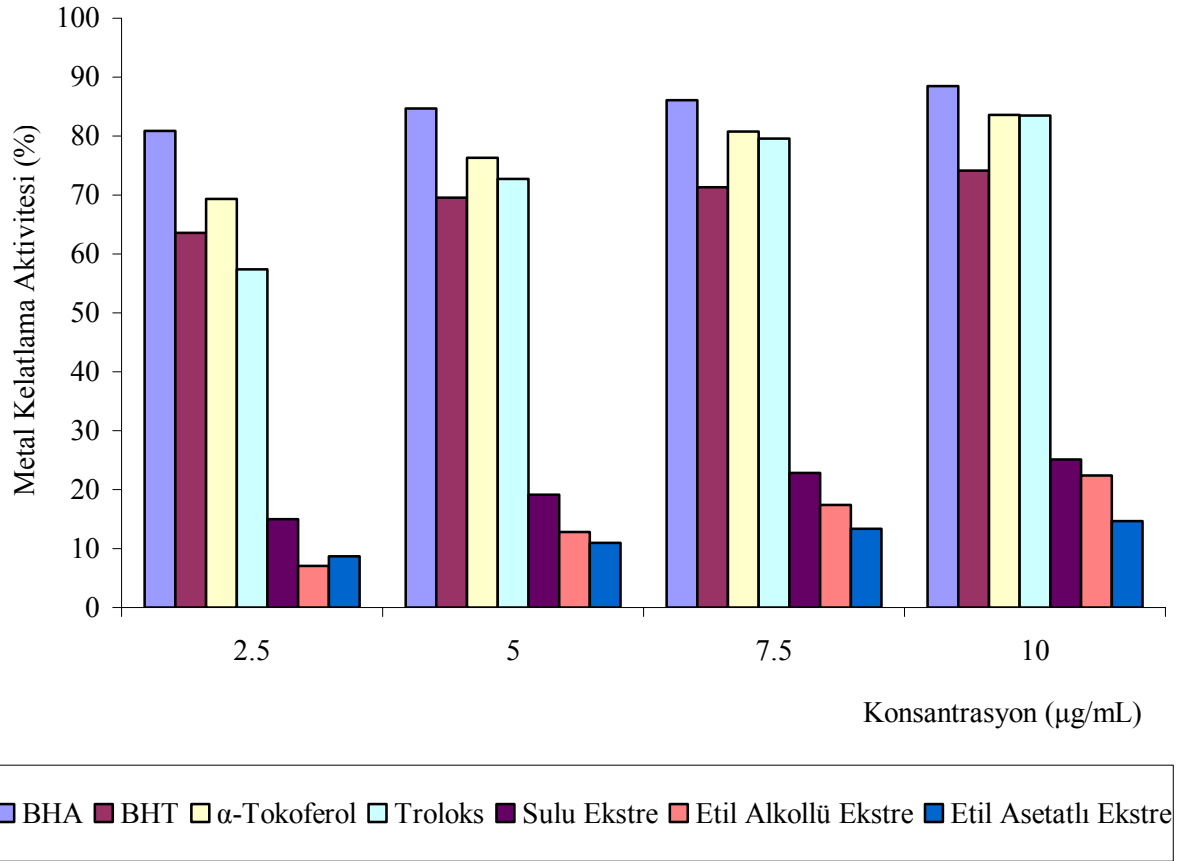


Şekil 4.9: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve askorbik asid, BHA ve Troloksun % DMPD radikal giderme aktiviteleri

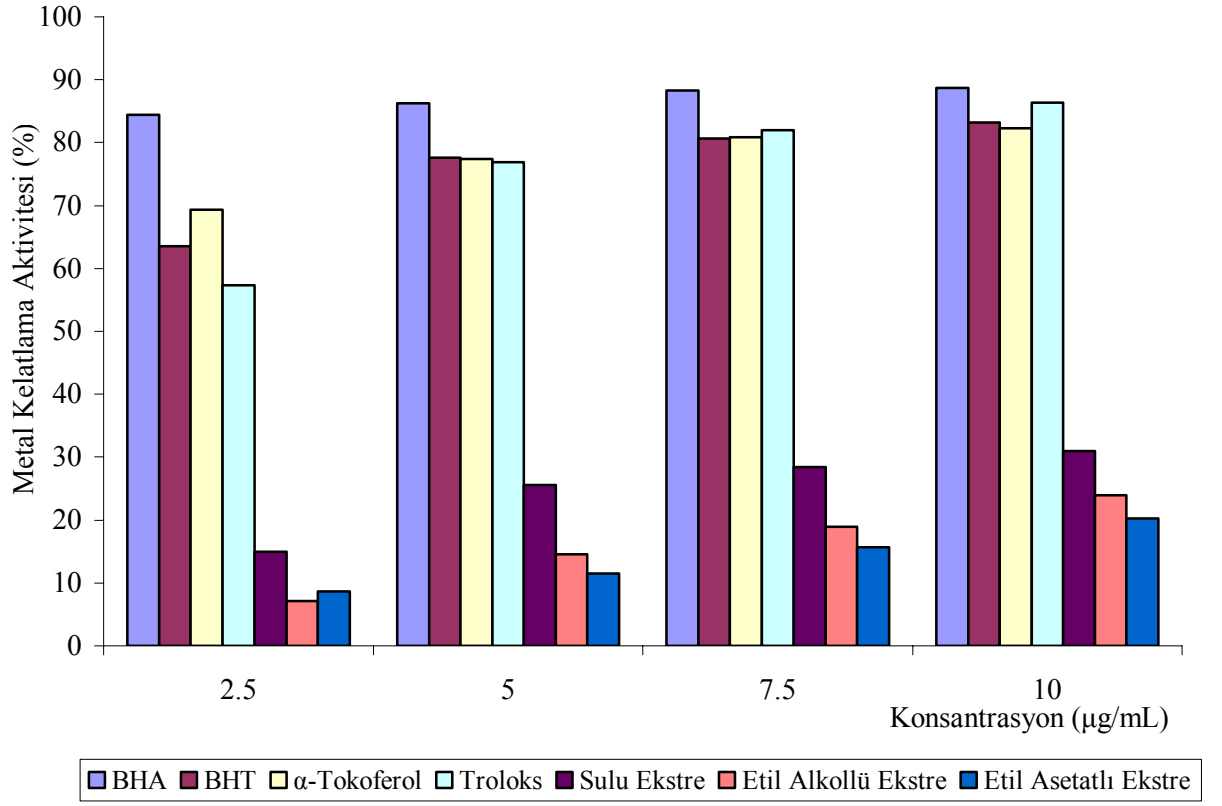
4.10. METAL KELATLAMA AKTİVİTESİ

Çalışmada sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstraların metal kelatlama aktiviteleri % inhibisyon olarak değerlendirildi ve BHA, BHT, Trolox ve α -tokoferolün metal kelatlama aktiviteleri karşılaştırıldı. Bu değerler Şekil 4.3-4.6' da verildi. Metal kelatlama aktivitesinin ekstralar arasında sulu ekstrede en yüksek oranda olduğu görüldü. Test edilen madde konsantrasyonu arttıkça metal kelatlama aktivitesinin de arttığı görüldü. Ekstrelerin 5., 10., 30. ve 60. dakikalarda hesaplanan % inhibisyon değerlerinden 60. dakikada zamana bağlı olarak en yüksek olduğu görüldü. Ekstrelerin

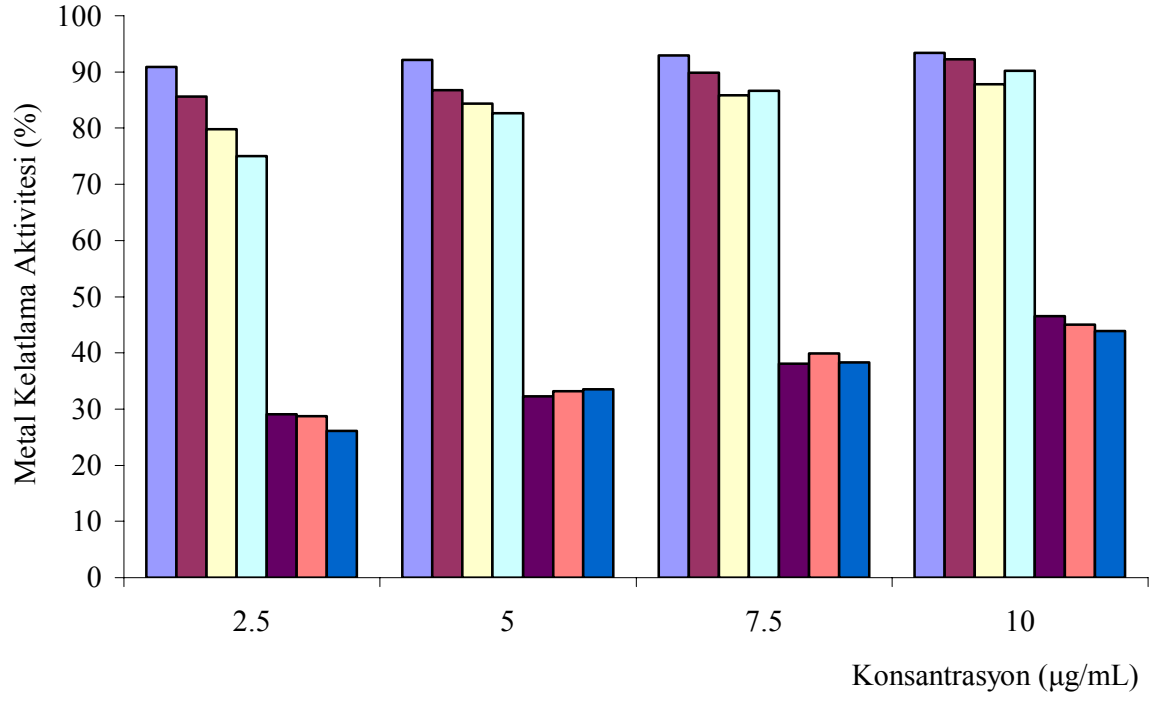
metal kelatlama aktivitesi sırasıyla sulu>etil alkollü>etil asetatlı ekstre şeklindedir (Şekil 4.10-4.14).



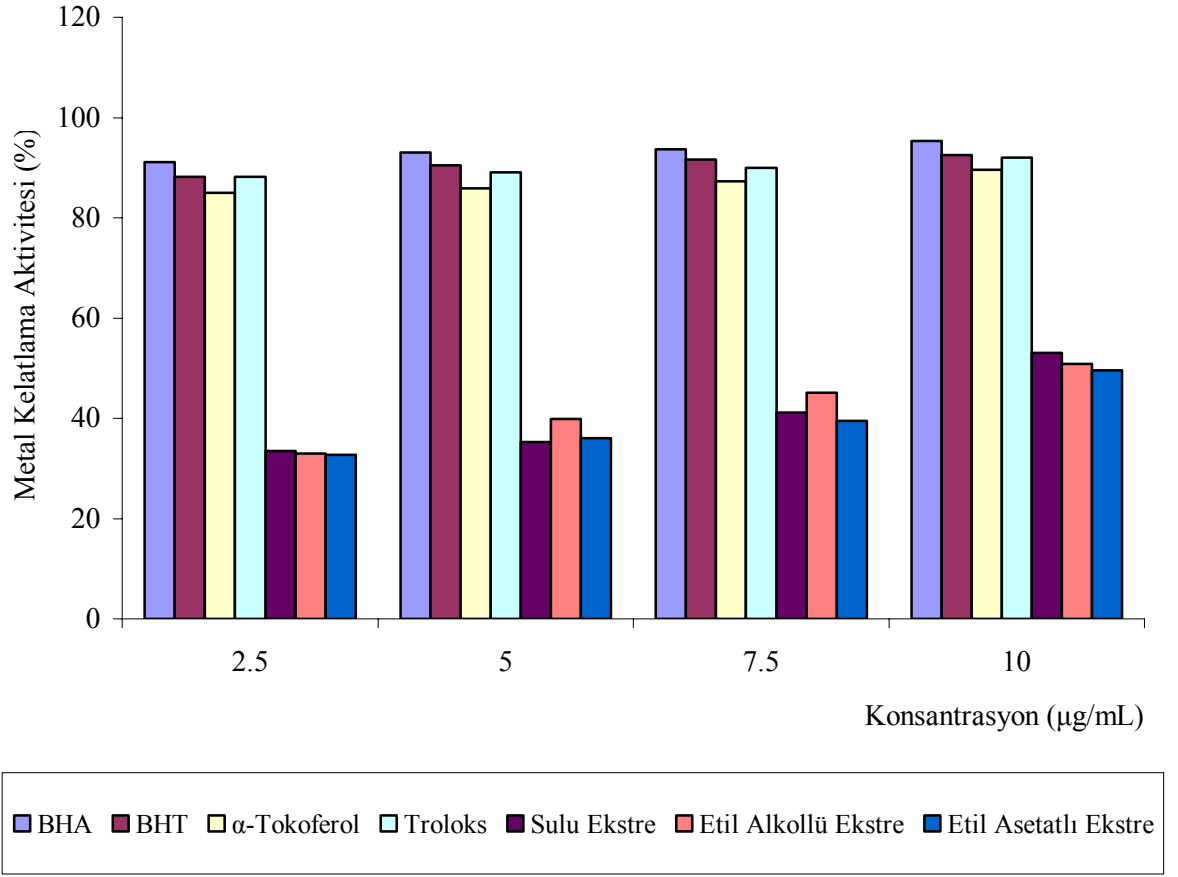
Şekil 4.10: Ispit bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, Troloks ve α-tokoferolün 5. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri



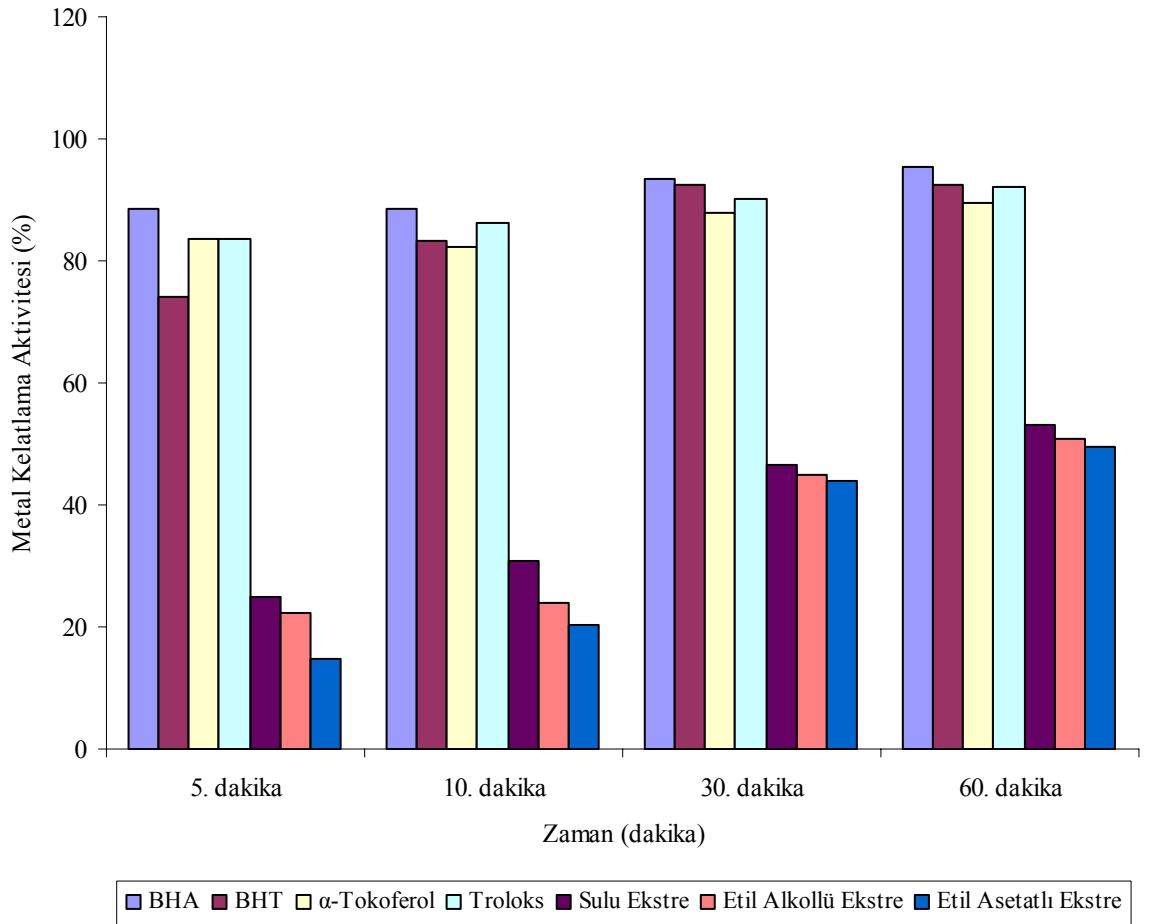
Şekil 4.11: Ispit bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve BHA, BHT, Troloks ve α-tokoferolün 10. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri



Şekil 4.12: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve BHA, BHT, Troloks ve α-tokoferolün 30. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri



Şekil 4.13: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve BHA, BHT, Troloks ve α-tokoferolün 60. dakikadaki % metal kelatlama aktiviteleri



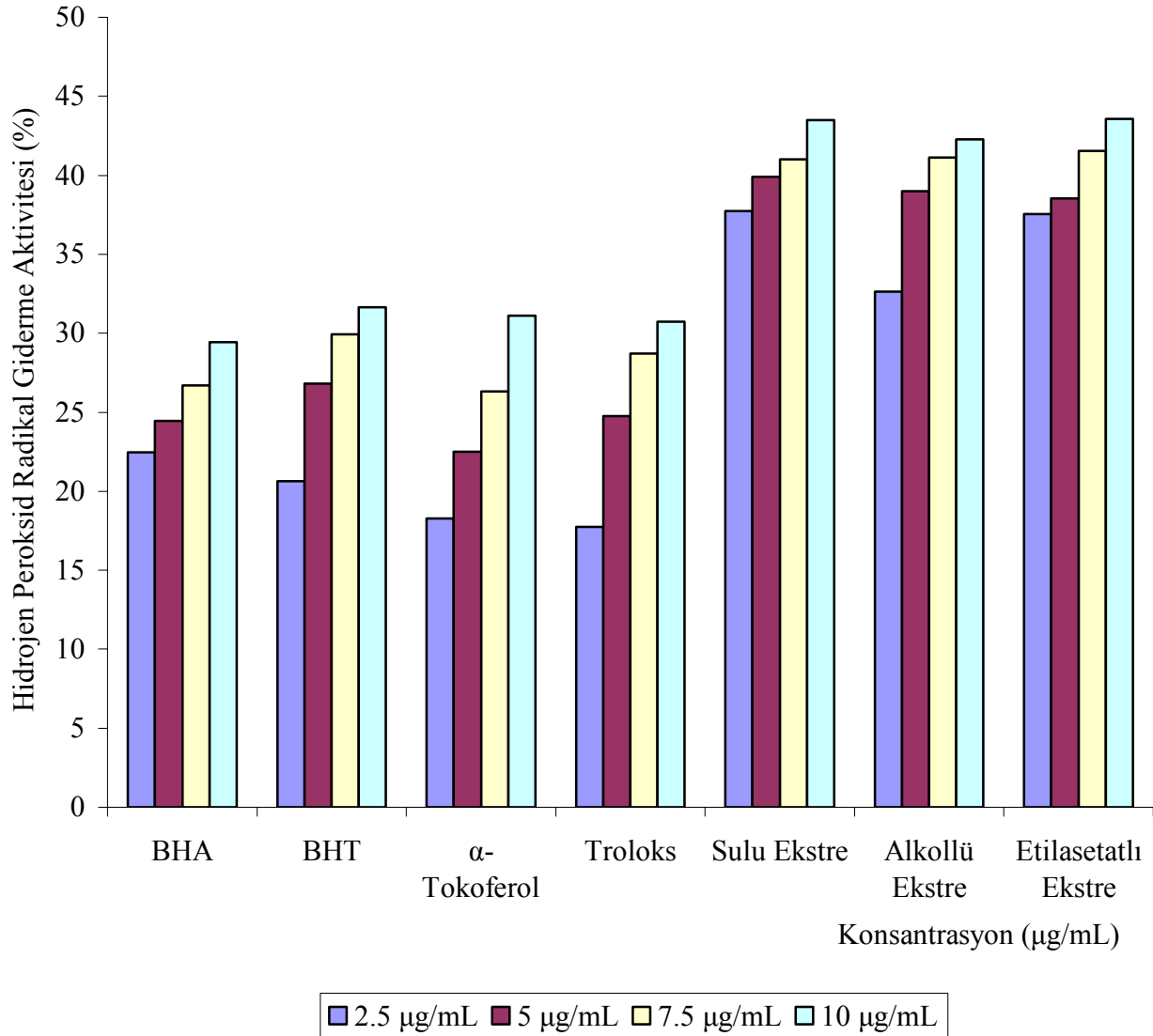
Şekil 4.14: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve BHA, BHT, Troloks ve α-tokoferolün 10 µg/mL derişimdeki % metal kelatlama aktiviteleri

4.11. H₂O₂ RADİKAL GİDERME AKTİVİTE TAYİNİ

Hidrojen peroksid bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer çünkü Fe²⁺ veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, superoksid radikalının varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksi radikalini oluşturur. Bu nedenle hidrojen peroksidin ortamdaki giderilmesi önemlidir.

Çalışmamızda BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks standartlarına karşı ekstralarının hidrojen peroksid radikal giderme aktiviteleri tayin edildi. Ekstrelerin standartlara kıyasla önemli ölçüde etkili olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda fenolik bileşik içeriği, flavonoid içeriği ile H₂O₂ radikal giderme aktivitesi arasında diğer antioksidan deneylerinde olduğu gibi yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Sulu ekstrada bu değerler

sırasıyla ($r^2=0.9434, 0.9728$), etil alkollü ekstrede ($r^2=0.88798, 0.9792$) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.8933, 0.9781$) olarak yüksek bir oranda korelasyon görülmüştür. Sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstrelerde H_2O_2 radikal giderme aktivitesinin standart olarak kullanılan BHA, BHT, α -tokoferol ve Trolokstan yüksek olduğu görülmektedir. Bu da bize ısıptın iyi bir antioksidan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

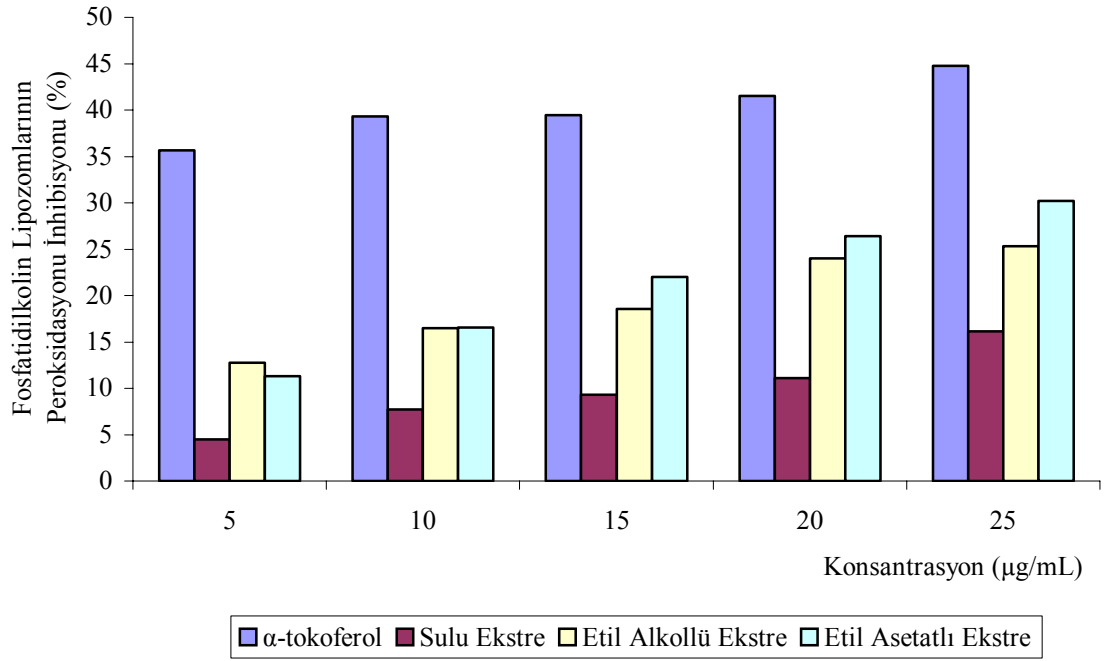


Şekil 4.15: Isıpt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin ve BHA, BHT, α -tokoferol ve Troloks standartlarının % H_2O_2 radikal giderme aktiviteleri

4.12. DEMİR (III) – ASKORBİK ASİD İLE İNDÜKLENMİŞ FOSFATİDİL KOLİN LİPOZOMLARININ PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ANTİOKSİDAN ETKİNİN İNCELENMESİ

Ekstrenin lesitinden hazırlanan lipozomlardan oluşturulan suni lipid sisteminin FeCl₃ ve askorbik asid ile inkübasyonu sonucu oluşan peroksid radikallerini giderme kapasitesini ölçmek amacıyla yapılan bu deneyde fosfolipidlerden oluşturulan lipozomlar, askorbik asid ve FeCl₃ varlığında lipid peroksidasyonuna uğrarlar ve biyolojik olarak aktif aldehitler (malondialdehit) oluşur. Malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asidin (TBA) reaksiyona girmesi ile oluşan tiyobarbitürik asid reaktif türlerinin (TBARS) pembe rengi 532 nm’de ölçülerek ekstrenin lipid peroksidasyonuna karşı aktivitesi tayin edilir. α -Tokoferol ve ekstreler lipid peroksidasyona karşı inhibisyon aktivitesi gösterirler. Ekstrelerin % lipid peroksidasyona karşı inhibisyon aktivitesi hesaplandığında etil asetatlı ekstre>etil alkollü ekstre>sulu ekstre olduğu bulundu. Standart olarak kullanılan α -tokoferolün ise en fazla aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.16).

Çalışmamızda lipozom peroksidasyon ile fenolik ve flavonoid miktarları arasında yine yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Sulu ekstrede bu korelasyon ($r^2=0.9780$), etil alkollü ekstrede ($r^2= 0.9980$) ve etil asetatlı ekstrede ise ($r^2=0.9598$) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.16: Ispıt bitkisinin sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstralarının ve α-tokoferol standartının % fosfatidilkolin lipozomlarının peroksidasyonu inhibisyonu

4.13. FERRİ İYONU REDÜKLEYİCİ ANTIOKSİDAN POTANSİYELİ (FRAP) DENEYİ

FRAP deneyinde $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$ antioksidan tarafından $[\text{Fe (II) (TPTZ)}_2]^{2+}$ ye indirgenir. Oksido-redüksiyon reaksiyonlarında rol alan demir DNA (deoksiribonükleik asid), protein ve lipidlere elektron taşıyarak oksidatif hasarı hızlandırır. Demir iyonları aynı zamanda lipid peroksidlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederek radikal zararını arttırırlar. Bu nedenle demir iyonlarının tutulmaları radikal zararlarını önlemede önem taşır. Tablo 4.5’de ekstraların mM/L cinsinden Fe^{3+} ’nın Fe^{2+} ’ya indirgenmesi olarak ifade edildi. Elde edilen sonuçlara baktığımızda etil asetatlı ekstre>alkollü ekstre>sulu ekstre şeklinde sıralandığı bulundu.

Tablo 4.5: İspitın sulu, etil alkollü, etil asetatlı ekstrelerinin FRAP değerlerinin miktarlarının Fe³⁺,nın Fe²⁺,ya indirgenmesi olarak değerlendirilmesi (mM/L) *

Ekstre Miktarı mg/mL	Sulu Ekstre (mM/L)	Etil Alkollü Ekstre (mM/L)	Etil Asetatlı Ekstre (mM/L)
2.0	0.360 ± 0.049	0.514 ± 0.032	0.721 ± 0.049
4.0	0.541 ± 0.046	0.681 ± 0.028	0.780 ± 0.038
6.0	0.729 ± 0.067	0.799 ± 0.028	0.847 ± 0.025
8.0	0.873 ± 0.055	0.878 ± 0.020	0.917 ± 0.042
10.0	0.919 ± 0.077	0.938 ± 0.026	1.013 ± 0.032

*Ortalama ± SD

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerin çeşitli biokimyasal ve farmakolojik etkilerinin antioksidanlarla ilgili olduğu son yıllarda öne sürülmekte ve bu ilişki tartışılmaktadır. Polifenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturmaktadırlar. Fenolik bileşikler içerisinde en fazla bulunanlar flavonoid ve fenolik asidlerdir [149, 150].

Fenolik bileşikler ve flavonoidler yaygın olarak bitkilerde bulunan ve biyolojik membrandaki lipid peroksidasyonunu inhibe eden doğal antioksidan yapılarıdır. Fenolik bileşikler ve flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin serbest radikalleri giderme, metal iyonlarla bileşik oluşturma ve singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür [151]. Antioksidanlar hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterirler ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürürler. Bu şekilde oluşan antioksidan radikali, oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki çiftleşmemiş elektronun yer değiştirmesi ile stabilize olur. Bu nedenle antioksidanlar moleküler yapılarında genellikle fenolik fonksiyon taşırlar.

Fenolik bileşikler gıdalarda buruk (prosiyanidinlerin 6-8 monomerli olanları) ve acı tadın kaynağı olup proteinlerle kompleks yaparak tortu oluştururlar ve berraklığı olumsuz etkilerler. Çalışmamızda kullanılan ısıt bitkisinin de buruk bir tadı bulunmaktadır. Bu da ısıtın fenolik bileşikler açısından zengin bir bileşik olduğunu bize göstermektedir [152].

Beslenmenin çeşitli hastalıkların önlenmesindeki rolü uzun zamandır bilinmekte olup, bu konu ile yapılan çalışmalarda besinlerin çeşitli mekanizmalarla oksidatif stresi azalttıkları tespit edilmiştir. Lipidlerin oksidasyonu birçok besinde kalite ve tat bozulmasına ve zehirli bileşiklerin oluşmasına neden olur ve yiyeceklerin kalite ve besin değerini düşürür. Lipid oksidasyonu yaş, membran hasarı, kalp krizi ve kanserle ilişkilidir [153]. Antioksidanlar lipid oksidasyonunu engellemekte, azaltmakta veya geciktirmektedir. Böylece hem gıdaların kalitesi korunmakta hem de bu gıdaların raf

ömürü uzamaktadır. Oksidasyonu önlemek veya ortadan kaldırmak amacıyla gıdalara çeşitli antioksidanlar ilave edilmektedir. Günümüzde en çok kullanılan antioksidanlar BHA, BHT, propil gallat (PG), tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)'dur. Son zamanlarda bu antioksidanların güvenilirlikleri toksisitelerinden dolayı sorgulanmaktadır [154]. Ayrıca BHA ve BHT'nin karaciğer hasarı ve kansere neden olduğu öne sürülmektedir [155, 156]. BHT düşük konsantrasyonda düşük mutajeniteye sahiptir, fakat yüksek konsantrasyonda mutajenitesi önemli oranda artmaktadır [157]. BHT'nin yüksek dozlarda fare ve gine domuzlarında ölümle sonuçlanabilecek iç ve dış kanamaya neden olabileceği rapor edilmiştir [158]. Son yıllarda sentetik antioksidanların mutajenik ve kanserojen olduğuna dair yapılan çalışmalardan dolayı doğal ve güvenli antioksidanlara büyük bir ilgi oluşmaktadır [159-161].

Meyve ve sebzeler, iyi bir antioksidan karışımı ve kombinasyonu ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaları nedeniyle çok önemli doğal antioksidan kaynakları arasında sayılmaktadır. Meyve ve sebzeler E vitamini, C vitamini, karotenoid gibi bileşiklere ilaveten güçlü antioksidan aktiviteye sahip flavon, kateşin, antosiyanin, izoflavon gibi fenolik bileşikler de içermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insanlarda koroner kalp hastalıkları ile alınan flavonoid miktarlarının ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda da kardiovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranının azalmasının C vitamini alımı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu ve buna benzer yapılan çalışmalarda kalp hastalıkları ile diyetel antioksidanların tüketimi arasında bir ilişki olduğu belirlenmiş ve antioksidan alımının kardiovasküler hastalıkların azalmasına neden olabileceği ileri sürülmüştür. Beslenme ile alınan antioksidanların rolü sadece kalp hastalıkları ile sınırlı değildir, antioksidan kanser ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalar, antioksidanlarca zengin sebze ve meyvelerin alımının azalmasının karaciğer, akciğer, pankreas ve daha birçok organda kanserin gelişmesinde major bir risk olduğunu göstermiştir.

İndirgeyici güç, bitkinin potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir. *Trachystemon orientalis*'in sulu ekstrelerinde indirgeyici güç, toplam fenolik bileşen içeriğiyle doğru orantılı olarak en yüksek bulunmuştur. Ayrıca ekstre miktarı arttıkça indirgeyici güç aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Bu çalışmada *Trachystemon orientalis*'in indirgeyici gücünün sulu ekstre>etil alkollü ekstre>etil asetatlı ekstre

olduğu bulunmuştur. Fenolik bileşik ile indirgeyici güç arasında korelasyonun olması bize bitkinin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

DPPH kararlı diyamagnetik molekül haline gelmek için bir elektron veya hidrojen radikali alan serbest bir radikaldir [162]. Serbest radikaller lipid peroksidasyonda yer alırlar ve birçok kronik hastalıkta önemli rol alırlar [20]. Bundan dolayı serbest radikalleri temizleme gücü önemli bir antioksidan özelliktir. Nispeten kararlı DPPH serbest radikali, serbest radikalleri temizlemek için kullanılabilir. *Trachystemon orientalis*'in çalışılan ekstrelerinden, etanollü ekstrelerinin DPPH içeriği yine toplam fenolik bileşen ieriğisiyle doğru orantılı olarak yüksek bulunmuştur.

Trachystemon orientalis'in hidroksi radikali giderme aktivitesi çalışılan konsantrasyonlarda sulu ekstrelerde hidroksi radikali giderme aktivitesi çok düşük gözlenirken, etil alkollü ekstrede 100 µg/mL konsantrasyonda en yüksek hidroksi radikali giderme aktivitesi gözlenmiştir. Hidroksi radikali giderme aktivitesi etil alkollü ekstre>etil asetatlı ekstre>sulu ekstre şeklinde aktivite göstermektedir.

DPPH serbest radikali doğal bileşiklerin serbest radikal süpürme aktivitesini belirlemek için kullanılmasına rağmen ABTS serbest radikali genellikle çözünürlük ve girişim sorunu ortaya çıktığında ve DPPH temelli tayinler yeterli gelmediği zaman kullanılır [163-165]. Çalışmamızda ABTS radikal giderme aktivitesi en yüksek oranda sulu ekstrede grlmştir.

Metal kelatlama kapasitesi lipid peroksidasyonda geçiş metallерinin konsantrasyonunu azalttığı için önemlidir. Kelatlayıcı etkenlerin metal iyonun okside formunu stabilize ederek redoks potansiyelini dşrdğı için ikincil antioksidanlar olarak etkili olduğu literatürde bildirilmiştir [166]. Çalışmamızda metal kelatlama aktivitesinin standart olarak kullandığımız maddelerden daha düşük bir değerde olduğu görülmektedir.

DMPD radikal giderme aktivite deneyi ile çalışmada antiradikal aktivite tayin edilmiştir. DMPD radikal giderme aktivite deneyinin bir oksidan çözelti varlığında ve asidik pH'da DMPD'nin stabil ve renkli bir radikal katyonu oluşturabilmesi esasına dayanır. Bu reaksiyon hızlı ve stabildir. Antioksidan kapasitenin bir ölçüsü olarak kabul

edilir. Bu nedenle bu deneme radikal hidrojen donörlerinin DMPD⁺’den single elektron yakalama kapasitesini gösterir [140]. Çalışmamızda etil asetatlı ekstrelerde DMPD radikal giderme aktivitesi BHA standardı ile benzer bulundu. Etil asetatlı ekstrelerin ve BHA standardının DMPD radikal giderme aktiviteleri sırasıyla 25 µg/mL konsantrasyonda % 22.14 ve % 23.53 ; 50 µg/mL konsantrasyonda % 29.11 ve % 27.58; 75 µg/mL konsantrasyonda % 33.09 ve % 31.39; 100 µg/mL konsantrasyonda ise % 34.32 ve 34.58’dir.

Hidrojen peroksid in vivo olarak pek çok oksidaz enzimi tarafından oluşturulabilir. Membranlardan geçebilir ve birçok bileşiği yavaşça okside edebilir. Hidrojen peroksidin kendisi çok fazla reaktif değildir, fakat hücrelere toksik olabilir, çünkü hücrelerde hidroksil radikali oluşturabilir. Kültür ortamında hücrelere hidrojen peroksid eklemek geçiş metali bağımlı, OH radikal aracılı DNA hasarına neden olabilir [166]. Çalışmamızda ısıtın standart olarak kullanılan maddelerden daha yüksek oranda H₂O₂ radikal yakalama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada ısıttan hazırlanan sulu, etil alkollü ve etil asetatlı ekstrelerin antioksidan aktiviteleri; hidroksi radikali, hidrojen peroksid giderme aktivitesi ve metal kelatlama aktivitesi gibi çeşitli antioksidan testler kullanılarak incelendi. Sonuçlar butillenmiş hidroksianisol, butillenmiş hidroksitoluen, Troloks, vitamin E gibi sentetik antioksidanlarda karşılaştırıldı. Standartlara göre en yüksek antioksidan aktivite, H₂O₂ radikal giderme testinde görüldü. Diğer antioksidan testlerden DPPH radikal giderici aktivitede de etil alkollü ekstrenin standartlara yakın aktivite gösterdiği saptandı. Total fenolik ve flavonoid, prolin en yüksek oranda ve etil asetatlı ekstrede, E vitamini ise en yüksek oranda etil alkollü ekstrede tespit edildi. İndirgeme gücü standarda göre düşük olmakla birlikte en yüksek sulu ekstrede tespit edildi. DPPH radikal giderici aktivite deneyinde etil alkollü ekstreler standartlara yakın aktivite gösterdi. Hidroksi radikal giderme aktivite deneyinde etil alkollü ekstre en yüksek fakat standartlardan düşük aktivite gösterdi. DMPD radikal giderme aktivite deneyinde standartlardan düşük olmakla birlikte etil asetatlı ekstrede en yüksek aktivite bulundu. Lipozom inhibisyon deneyinde etil asetatlı ekstre standartlardan düşük fakat en yüksek aktivite gösterdi. FRAP deneyinde etil asetatlı ekstre en yüksek aktivite gösterdi.

Sonuç olarak çalışmada ekstrelerin bütün testlerde antioksidan aktivite gösterdiği ve bu ekstrelerin doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. CENGİZ, G., AKSOY, N., AKTAY, G., SÖYLEMEZOĞLU, T., 1999, Effects of paracetamol and aspirin on lipid peroxidation in plasma and liver, *Journal of Faculty of Pharmacology*, Ankara University, 28, 47-60.
2. NG, T.B., LIU, F., WANG Z.T., 2000, Antioxidant activity of natural products from plants, *Life Science*, 66, 709-723.
3. ARDOIN, S.P., SUNDY, S.J., 2006, Update on non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Current Opinion in Rheumatology*, 18, 221-226.
4. HALLIWELL, B., 1991, Reactive oxygen species in living systems, *The American Journal of Medicine*, 91, 14-21.
5. HALLIWELL, B., 1994, Free radicals, antioxidants and human disease, curiosity cause, of consequence?, *The Lancet*, 344, 721-724.
6. BAST, A., HAENEN, G. R. M. M., DOELMAN, C. J. A., 1991, Oxidant and antioksidant stage of the art, *The American Journal of Medicine*, 91, 2-12.
7. TURE, T., 1998, *Akut miyokard infarktüsünde SOD ve GSHPx enzimleri ile E ve C vitaminlerinin düzeyleri*, Uzmanlık Tezi, T.C Sağlık Bakanlığı İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir.
8. AKKUŞ, I., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, 5. Sağlık Dizisi.
9. REPINE, J. E., 1991, Oxidant-antioxidant balance, some observations from studies of ischemia reperfusion in solated perfused rat hearts, *The American Journal of Medicine*, 91, 45-53.

10. UYSAL, M., 1998, Serbest radikaller, lipit peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesi etkileyen koşullar, *Klinik Gelişim*, 11, 336-341.
11. CEVRİM, E., 2000, *Sigara içenlerde antioksidan enzimler, ferritin ve hemoglobin düzeylerinin değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya.
12. GOODYEAR-BRUNCH, C., PIERCE, J. D., 2002, Oxidative stress in critically ill patient, *American Journal of Critical Care*, 11, 543-551.
13. YOSHIKAWA, T., NAITO, Y., KISHI, A., TOMII, T., KANEKO, T., LINUMA, S., ICHIKAWA, H., YASUDA, M., TAKAHASHI, S., KONDO, M., 1993, Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats, *Gut*, 34, 732-737.
14. KISE, Y., YOSHIMURA, S., AKIEDA, K., UMEZAWA, K., OKADA, K., YOSHITAKE, N., SHIRAMIZU, H., YAMAMOTO, I., INOKUCHI, S., 2004, Acute oral selenium intoxication with ten times the lethal dose resulting in deep gastric ulcer, *The Journal of Emergency Medicine*, 26, 183-187.
15. GUTTERIDGE, J.M.C., 1989, Iron and oxygen: A biologically damaging mixture, *Acta Paediatrica Scandinavica Supplement*, 361, 78-85.
16. SOHAL, R.S., 2002, Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 37-44.
17. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., 2001, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed., Oxford Science publications, pp 22-24.
18. KILINÇ K., KILINÇ A., 2002, Oksijen toksitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33, 110-118.

19. BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K. V., 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress:a review, *Annals of Botany*, 91, 179-194.
20. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1989, Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, 543, Oxford.
21. HASANI, A., 1999, *Sıçanlarda kafa travması sonrası artan serbest oksijen radikalleri üzerine sevofluranın etkisi*, Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İstanbul.
22. CAKATAY U., TELCI A., 2000, Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar, *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 63, 314-317.
23. CELIK, S., 2001, *APS ile Opere edilen tavşanların kan ve karaciğer dokularındaki serbest oksijen radikallerinin antioksidan enzim düzeylerinin tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya.
24. KILICOGLU-AYDIN B., *Aspirin ve E vitamini verilmiş ratlarda karaciğerde yapılan iskemi/reperfüzyon sonrası kanda radikal süpürücü enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerin araştırılması*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
25. KAVAS, G., 1989, Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klinikleri*, 9, 1-8.
26. ABDOLLAHI, M., RANJBAR, A., SHADNIA, S., NIKFAR, S., REZAIE, A., 2004, Pesticides and oxidative stress: A review, *Medical Science and Monitoring*, 10, 141-147.
27. HALLIWELL B., 1997, Antioxidants and human disease: a general introduction, *Nutrition Reviews*, 55, 544-549.

28. STIEF T. W., 2003, The physiology and pharmacology of singlet oxygen, *Medical Hypotheses*, 60, 567-572.
29. YU, B. P., 1994, Cellular defense against damage from reactive oxygen species, *Physiological Reviews*, 74, 139-162.
30. ASHOK B., ALI R., 1999, The aging paradox: free radical theory of aging, *Experimental Gerontology*, 34, 293-303.
31. LEE J. H., OZCELİK B., MIN D. B., 2003, Electron donation mechanisms of β -carotene as a free radical scavenger, *Journal of Food Science*, 68, 861-865.
32. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1984, Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1-4.
33. HALLIWELL B., 2006, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*, 141, 312-322.
34. MAVI, A., 2005, *İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksid dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
35. İŞLEKEL H., İŞLEKEL S., GUNER G., OZDAMAR, N., 1999, Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia–reperfusion, *Brain Research*, 843, 18-24.
36. SALEEM, M., OHSHIMA, H., 2004, Xanthine oxidase converts nitric oxide to nitroxyl that inactivates the enzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 455-462.

37. VALKO M., LEIBFRITZ, D., MONCOL J., CRONIN M. T. D., MAZUR M., TELSER J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
38. KLATT P. VE LAMAS S., 2000, Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress, *European Journal of Biochemistry*, 267, 4928-4944.
39. RIDNOUR L. A., THOMAS D. D., MANCARDI D., ESPAY M. G., MIRANDA K. M., PAOLOCCI N., 2004, The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations, *Biological Chemistry*, 385, 1-10.
40. FANG Y. Z., YANG S., WU G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18, 872-879.
41. HALLIWELL, B., 1996, Uric acid: an example of antioxidant evaluation, *Handbook of antioxidants*, New York, Marcel Dekker, sf. 243-256.
42. BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M., 1999, Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences*, 65, 1865-1874.
43. NOGUCHI N., NIKI E., 1999, Chemistry of active oxygen species and antioxidants, *Antioxidant status, diet, nutrition and health*, Boca Raton, CRC Press, pp 3-20.
44. PAPAS A. M., 1999, Determinants of antioxidant status in humans, *Antioxidant status, diet, nutrition and health*, Boca Raton, CRC Press, pp 21-36.
45. LAMBETH, J. D., 2004, NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews, Immunology*, 4, 181-189.
46. MOLDOVAN, L., MOLDOVAN, N.I., 2004, Oxygen free radicals and redox biology of organelles, *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 395-412.

47. GREEN, P., GLOZMAN, S., WEINER, L., YAVIN, E., 2001, Enhanced free radical scavenging and decreased lipid peroxidation in the rat fetal brain after treatment with ethyl decosaheptaenoate, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1532, 203-212.
48. GUTTERIDGE, J. M. C., HALLIWELL, B., 1990, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, *Trends in Biochemical Science*, 15, 129-135.
49. GIROTTI A., 1998, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *The Journal of Lipid Research*, 39, 1529-1542.
50. FREI B., 1995, Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low density lipoprotein oxidation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 83-98.
51. ÖNENÇ, S. S., AÇIKGÖZ, Z., 2005, Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri, *Hayvansal Üretim*, 46, 50-55.
52. ÇAKMAK, B., 2003, Yemlik yağlarda oksidasyon ve korunma yöntemleri, NRA Bülteni, Haziran, 28.
53. ÖZELÇİ-KAVAS, G., 1989, Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 9, 1-8.
54. MUKAI, F.H., GOLDSTEIN B.D., 1976, Mutagenicity of malondialdehyde: a decomposition product of polyunsaturated fatty acids, *Science*, 191, 868-869.
55. BERLETT, B. S., STADTMAN, E. R., 1997, Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.
56. JECKINS, D. J., KENDAL, C. W., MACHIE, A., PARKER, T. L., CONELLY, P. W., OLAN, W., HAIGHT, J. S., FAULKNER, D., VIDGEN, E., LAPSLEY, K. G., SPILLER, G. A., 2002, Dose response of almonds on coronary heart disease risk

factors: blood lipids, oxidized low density lipoproteins, lipoprotein (a), homocystein, and pulmonary nitric oxide: A randomized, controlled, crossover trial, *Circulation*, 106, 1327-1332.

57. ÖZEN T., 2003, *Bazı bitkilerin antioksidan aktivitesinin in vitro ve in vivo araştırılması*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Samsun.

58. AKPOYRAZ M., DURAK İ., 1995, Serbest radikallerin biyolojik etkileri, *Ankara Tıp Mecmuası*, 48, 253-262.

59. RIKANS, L. E., HORN BROOK, K. R., 1997, Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1362, 116-127.

60. ÖZKAN A., FIŞKIN K., 2004, Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler, *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14, 52-60.

61. SCHRAUFSTATTER, I. U., HINSHAW, D. B., HYSLOP, P. A., SPRAGG, R. G., COCHRANE, C.G, 1986, Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide, *The Journal of Clinical Investigation*, 77, 1312-1320.

62. BIRNBOIM H. C., KANABUS-KAMINSKA, M., 1985, The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide anion may involve a metabolic process, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 6820-6824.

63. DEMELLO FILHO A. C., MENEGHINI, R., 1985, Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species, *Biochimica et Biophysica Acta*, 847, 82-89.

64. FLOYD, R. A., 1981, DNA-ferrous ion catalyzed hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 99, 1209-1215.
65. OCHI, T., CERUTTI, P. A., 1987, Clastogenic action of hydroperoxy-5,8,11,13-icosatetraenoic acids on the mouse embryo fibroblasts C3H/10T1/2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 990-994.
66. TORUN, M., YARDIM, S., 1993, Serbest radikallerin kalp-damar hastalıkları ile ilişkisi ve savunma mekanizmaları, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 173-184.
67. KIRALAN, M., ERCOŞKUN, H., İŞIKSAL, S., 2004, Gıda antioksidanları ve etki mekanizmaları, *Akademik Gıda*, 2, 5-14.
68. NISHINO, H., 1999, Cancer prevention by natural carotenoids, antioxidant food supplements in human health, Ed. By PACKER, L., HIRAMASTU, M., YOSHIKAWA, T., Academic Press, USA.
69. ALTAN, N., DİNÇEL, A. S., KOCA, C., 2006, Diabetes mellitus ve oksidatif stress, *Türk Biyokimya Dergisi*, 31, 51-56.
70. KANTER, M., 1995, Free radicals and exercise .Effects Of nutritional antioxidant supplementation, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 23, 375-397.
71. STAHL, W., SİES, H., 2005, Bioactivity and protective effects of natural carotenoids, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, 101-107.
72. YANARDAG, R., OZSOY-SACAN, O., OZDIL, S., BOLKENT, S., 2007, Combined effects of vitamin c, vitamin e, and sodium selenate supplementation on absolute ethanol-induced injury in various organs of rats, *International Journal of Toxicology*, 26, 513-523.

73. BENOVA L., FRIDOVICH I., 1998, Growth in iron enriched medium partially compensates *Escherichia coli* for the lack of manganese and iron superoxide dismutase, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 10313-10316.
74. WHITTAKER, M., WHITTAKER, J. W., 1998, A glutamate bridge is essential for dimer stability and metal selectivity in manganese superoxide dismutase, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 22188-22193.
75. RAHA, S., ROBINSON, B. H., 2000, Mitochondria oxygen free radicals, disease, and aging, *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 502-508.
76. GUAN, Y., HICKEY, M. J., BORGSTAHL, G. E., HALLEWELL, R. A., LEPOCK, J. R., O'CONNOR, D., HSIEH, Y., NICK, H. S., SILVERMAN, D. N., TAINER, J. A., 1998, Crystal structure of Y734F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34, *Biochemistry*, 37, 4722-4730.
77. KINNULA, V. L., PAAKKO P., SOINI Y., 2004, Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung, *FEBS Letters*, 569, 1-6.
78. KINNULA, V. L., CRAPO J. D., 2004, Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors, *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 718-744.
79. ADACHI T., WANG X. L., 1998, Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism, *FEBS Letters*, 433, 166-168.
80. YOUNG H., KIM, E. J., ROE, J. H., HAH C. Y., KANG S. O., 1996, A novel nickel containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp., *Biochemical Journal*, 318, 889-896.
81. LLEDIAS, F., RANGEL, P., HANSBERG, W., 1998, Oxidation of catalase by singlet oxygen, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 10630-10637.

82. MEMİŞOĞULLARI, R., 2006, Diyabette serbest radikaller ve antioksidanlar, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
83. CHERUBINI, A., RUGGIERO C., POLIDORI, M. C., MECOCCHI, C., 2005, Potential markers of oxidative stress in stroke, *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 841-852.
84. RUCH, R. T., CHENG S. J., KLAWNİG E., 1989, Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008.
85. SANCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., ANCOS, D. B., CANO, M. P., 2003, Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 430-439.
86. LANDVIK, S. V., DIPLOCK, A. T., PACKER, L., 1996, Efficacy of vitamin E in human health and disease, In Handbook of Antioxidants. E. Cadenas and L. Packer, editors. Marcel Dekker, Inc. New York. 71–87.
87. TOSUN, İ., ÜSTÜN, N. S., 2003, An investigation about antioxidant capacity of fruit nectars, *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 167-169.
88. BENZIE, I. F., SZETO, Y. T., 1999, Total antioxidant power of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633-636.
89. PETTINARI, A., AMICI, M., CUCCIOIONI, M., FLORETTI, E., ELEUTERI, A. M., 2006, Effect of polyphenolic compounds on the preteolytic activities of constitutive and immuno-proteasomes, *Antioxidants and Redox Signaling*, 8, 121-129.

90. STOCKER R., FREI B., 1991, Endogenous antioxidant defense in human blood plasma, *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*, London, Academic Press, sf. 213-243.
91. GARDNER, P. T., WHITE, T. A. C., MCPHAIL, D. B., DUTHIE, G., 2000, The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices, *Food Chemistry*, 68, 471-474.
92. HALLIWELL. B., 1996, Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research*, 25, 439-454.
93. WOODALL, A. A., AMES, B. N., 1997, Diet and oxidative damage to DNA: the importance of ascorbate as an antioxidant, vitamin C in health and disease, Markel Dekker, New York, pp 193-203.
94. BENDICH, A., 1997, Vitamin c safety in humans, vitamin C in health and disease, Markel Dekker, New York, pp 367-369.
95. KRINSKY N. I., 1998, Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218, 95-97.
96. ZHANG, Y., FUNG, W-M., 1994, The role of ascorbic acid and other antioxidants in the erythrocyte in reducing membrane nitroxide radicals, *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 215-222.
97. TRIBLE, D. L., FRANK, E., 1994, Dietary antioxidants, cancer, and atherosclerotic disease, *The Western Journal of Medicine*, 161, 605-613.
98. MOLLER, J. K. S., MADSEN, H. L., AALTONEN, T., SKIBSTED, L. H., 1999, Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants, *Food Chemistry*, 64, 215-219.

99. KÖKSAL E., 2007, *Karnabahar (Brassica oleracea L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
100. GAZIANO, M. J., HENNEKENS, C. H., 1993, The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease, *Annals of the New York Academy of the Sciences*, 691, 148-155.
101. QUIROS, A. R. B., COSTA, H. S., 2006, Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review, *Journal of Food Composition and Analysis*, Williams and Wilkins, Baltimore, 0781741335.
102. STAHL, W., SIES, H., 1996, Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336, 1-9.
103. LESSIN, W. J., CATIGANI, G. I., SCHWARTZ, S. J., Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3728-3732.
104. LIEBLER, D. C., 1993, Antioxidant reactions of carotenoids, *Annals of the New York Academy of the Sciences*, 691, 20-31.
105. RICE EVANS, K., 1999, Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity, *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Academic Press, London.
106. PETERSON J., DWYER, J., 1998, Flavonoids, dietary occurrence and biochemical activity, *Nutrition Research*, 18, 1995-2018.
107. PIETTA, P., SIMONETTI, P., 1999, Dietary flavonoids and interaction with physiological antioxidants, *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Academic Press, London.

108. MAVİ, A., 2005, *İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksid dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
109. BRANEN, A. L., 1975, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 52, 59-63.
110. K., FUKUSHİMA. S., SHİVAİ. T., OHTANİ. M., NAKANİSHİ. K., ITO. N., 1983, Promoting activities of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl trans peptidase-positive foci development in the liver of rats, *Carcinogenesis*, 4, 969–978.
111. BAYTOP, T., 1999, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
112. SEZİK, E., TABATA, M., YEŞİLADA, E., HONDA, G., GOTO, K., IKESHIRO, Y., 1991, Traditional Medicine in Turkey 1. Folk medicine in Nort-East Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology* 35, 191-196.
113. SEZİK E., YEŞİLADA E., HONDA G., TAKAISHI Y., TAKEDA Y., TANAKA T. 2001, Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 95-115.
114. YEŞİLADA, E., SEZİK, E., 1998, Phytotherapie in der Türkei, *Zei tschrift für Phytotherapie*, 19, 132-138.
115. ŞİMŞEK I., AYTEKİN F., YEŞİLADA E., YILDIRIMLI Ş., 2002, Anadolu’da halk arasında bitkilerin kullanılış amaçları üzerinde etnobotanik bir çalışma, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir. Eds. K.H.C. Başer, N. Kırimer (ISBN 975-94077-2-8), Eskişehir, 434-457 (2004).

116. HILGER, H. H., SELVI, F., PAPINI, A., BIGAZZI, M., 2004, Molecular systematics of boraginaceae tribe boragineae based on ITS1 and trnL sequences, with special reference to *Anchusa s.l.*, *Annals of Botany*, 94, 201-212.
117. TANKER, N., KOVUNCU, M., COŞKUN, M., 2004, Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 88, Ankara, 975-482-628-5.
118. BAYTOP T., 1994, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Ankara: Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları: 578, 9751605429.
119. KARAGÖZ, A., CEVAHİR, G., ÖZCAN, T., SADIKOĞLU, N., YENTÜR, S. ve KURU, A., 2002, Bazı yüksek bitkilerden hazırlanan sulu ekstraktların antiviral aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi, *XIV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 29-31 Mayıs, 318-321 Eskişehir, Eds. K.H.C. Başer ve N. Kırimer.
120. AKÇİN, Ö. A., KANDEMİR, N., AKÇİN, Y., 2004, A morphological and anatomical study on a medicinal and edible plant *Trachystemon orientalis* (L.) G.Don (Boraginaceae) in the Black Sea region, *Turkish Journal of Botany*, 28, 435-442.
121. TÜRKAY, S., ÖZGÜL-YÜCEL, S., ÜSTÜN , G., 2005, “Türkiye’nin gamma linolenik asid kaynakları ve potansiyeli üzerine bir çalışma” 4. GAP Tarım Kongresi, 21-23 Eylül, Urfa, 576-580.
122. UZUN, E., SARIYAR, G., ADSERSEN, A., KARAKOÇ, B., ÖTÜK, G., OKTAYOĞLU, E., PIRILDAR, S., 2004, Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 287–296.
123. YEŞİLADA, E., SEZİK, E., HONDA G., TAKAISHI Y., TAKEDA Y., TANAKA T., 1999, Traditional Medicine in Turkey IX. Folk medicine in North-west Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 195-210.

124. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trachystemon_orientalis_C.jpg [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
125. <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/69969/> [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
126. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trachystemon_orientalis_D.jpg [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
127. <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/143933/> [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
128. <http://aysegulmutfakta.blogspot.com/2008/04/spt-kavurmas.html> [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
129. http://www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2008/04/trachystemon_orientalis.php [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
130. http://www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2008/04/trachystemon_orientalis.php [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
131. http://ecommons.cornell.edu/bitstream/1813/705/2/87-053B_PL.jpg [Ziyaret Tarihi: 7 Şubat 2010].
132. SLINKARD, K., SINGLETON, V. L., 1977, Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
133. ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W., 1999, The determination of Flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64, 555-559.

134. KARAGÖZLER, A. A, ERDAĞ, B., EMEK, Y. Ç. ve UYGUN, D.A., 2008, Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400-407.
135. DEACON, D.B., WAMBLE A.C., 1954, Vitamin E analytical procedure for cottonseed and its products, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 31, 284-287.
136. OYAIZU M., 1986, Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
137. HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
138. NAGAI, T., MYODA, T., NAGASHIMA, T., 2005, Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (*tsukushi*), *Equisetum arvense* L., *Food Chemistry*, 91, 389-394.
139. OSMAN, A. M., WONG, K. K. Y., FERNYHOUGH, A., 2006, ABTS radical driven-oxidation of polyphenols: Isolation and elucidation of covalent adducts, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 321-329.
140. FOGLIANO V., VERDE, V., RANDAZZO, G., RITIENI, A., 1999, Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1035-1040.
141. JUNTACHOTE, T., BERGHOFER, E., 2005, Antioxidative properties and stability of holy basil and galangal, *Food Chemistry*, 92, 193-202.
142. DECKER, E. A, WELCH, B., 1990, Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677.

143. CHATTERJEE, S. N., AGARWAL, S., 1998, Liposomes as a membrane model for study of lipid peroxidation, *Free Radical Biology and Medicine*, 4, 51-72.
144. DUH, P. D., TU, Y. Y., ve YEN G. C. 1999, Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium Ramat*), *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, 269-277.
145. BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
146. MEIR S., KANNER, J., AKIRI, B., HADAS, S.P., 1995, Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1813-1819.
147. SHANNON, M.C., 1997, Adaptation of plants to salinity, *Advances in Agronomy*, 60, 75-120.
148. OZSOY, N., CAN, A., YANARDAĞ, R., AKEV, N., 2008, Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts, *Food Chemistry*, 110, 571-583.
149. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P. M., PRIDHAM, J. B., 1995, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383.
150. VAN ACKER, S., VAN-DEN BERG, D. J., TROMP, M. N., GRIFFIOEN, D. H., VAN BEBBEKOM, W. P., VAN DER, W. J. F., BAST, A., 1996, Structural aspects of antioxidants activity of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 331-342.
151. COOK, N. C., SAMMAN, S., 1996, Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.

152. EKŞİ, A., KARADENİZ, E., 2002, Fenoliklerin gıda bileşeni olarak önemi, *Dünya Gıda*, 6, 79-82.
153. RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., OCHI, H., KAWAKISHI, S., 1995, The contribution of plant food antioxidants to human health, *Trends in Food Sciences and Technology*, 6, 75-82.
154. SUN, B., FUKUHARA, M., 1997, Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug metabolizing enzymes in mice, *Toxicology*, 122, 61-72.
155. WICHI, H. P., 1988, Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium, *Food and Chemical Toxicology*, 26, 717-723.
156. SHERWIN, F. R., 1990, Antioxidants, Food Additives, Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 139-191.
157. SHAHIDI, F., WANASUNDURA, P. D., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, 32, 67-103.
158. CHEN, C. H., PEARSON, A.M., GRAY, J.I., 1992, Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds, *Food Chemistry*, 43, 177-183.
159. MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMINGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., NUNEZ, M.J., PARAJO, J.C., 2001, Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72, 145-171.
160. GÜLÇİN, İ., 2006, Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), *Toxicology*, 217, 213-220.

161. OKTAY, M., GÜLÇİN, İ., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., 2003, Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, *Lebensmittel Wissenschaft und-Technology*, 36, 263-271.
162. SOARES, J.R., DINIS, T.C.P., CUNHA, A.P., ALMEIDA, L.M., 1997, Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*, *Free Radical Research*, 26, 469-478.
163. ARNAO, M. B., 2000, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: *A practical case*, *Trends in Food Science and Technology*, 11, 419–421.
164. DASTMALCHI, K., DORMAN, H. J. D., KOŞAR, M., HILTUNEN, R., 2007, Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble extract of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract, *Food Science and Technology*, 40, 239–248.
165. DORMAN, H. J. D., HILTUNEN, R., 2004, Fe(III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions, *Food Chemistry*, 88, 193–199.
166. GÜLÇİN, İ., ELIAS, R., GEPDIREMEN, A., BOYER, L., KÖKSAL, E., 2007, A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts, *African Journal of Biotechnology*, 6, 410–418.

ÖZGEÇMİŞ

Muhammed Mutluhan DÖĞER, 21.01.1974 tarihinde Malatya’da doğdu. Malatyada başladığı ilk öğrenimini İstanbul’da tamamlayarak, orta ve lise öğrenimine İstanbul’da devam etti. 1994 yılında girdiği İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden 1998’de mezun oldu. İş hayatına 1999 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak başladı. Aralık 1999 yılında, halen görev yapmakta olduğu İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’na yüksek lisans ve doktora eğitimi görmek üzere gönderildi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı’nda 1999 yılında başladı ve “Krom-3-Klorür ve Niasin’in Hiperlipidemili Sıçanların Karaciğeri Üzerine Etkisi” konulu yüksek lisans tez çalışmasını 2002 yılında tamamladı. Halen aynı birimde çalışmasına devam etmektedir. İngilizce bilmektedir. Evlidir.