

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SAKKI ELMASI (*Malus communis* L.)'NİN MEYVE VE ÇEKİRDEK  
KISIMLARININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN  
MUKAYESESİ**

**Mehmet MORTAŞ**

**Danışman: Doç. Dr. Taha Abdülkadir ÇOBAN**

**KİMYA  
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN  
2012**

**Her Hakkı Saklıdır**

Doç. Dr. Taha Abdülkadir ÇOBAN danışmanlığında, Mehmet MORTAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 14/08/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Taha Abdülkadir ÇOBAN

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Salih MUTLU

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Doç. Dr. Recep POLAT  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü 

**ÖZET**

Yüksek Lisans Tezi

**SAKKI ELMASI (*Malus communis* L.)'NİN MEYVE VE ÇEKİRDEK KISIMLARININ ANTIÖKSİDAN AKTİVİTELERİNİN MUKAYESESİ**

Mehmet MORTAŞ

Erzincan Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Taha Abdülkadir ÇOBAN

Bu çalışma Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktivitesini incelemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elma Erzincan ili Üzümlü ilçesinden toplandı, kurutuldu ve etanol ekstraları hazırlandı. Hazırlanan etanol ekstraları üzerinde ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, kuprak metodu ile  $\text{Cu}^{2+}$  ve potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) giderme aktivitesi tayinleri ve toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktar tayinleri yapıldı. Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarından elde edilen  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonluk etanol ekstralarının linoleik asit emülsiyonunun lipit peroksidasyonunu sırasıyla %69.93 ve %70.70 inhibe ettiği gözlemlendi. Aynı konsantrasyonda  $\alpha$ -Tokoferol %85.30 ve troloks %83.10' luk bir inhibisyona sebep olmuştur. Toplam fenolik bileşik içeriği çekirdek kısmında meyveden daha fazla olduğu tespit edilen elmanın toplam flavonoit içeriği meyvede daha yüksek bulunmuştur. Meyvede çekirdekten biraz daha yüksek olmakla birlikte birbirine yakın olan DPPH giderme ve metal indirgeme aktivitesinin standartlardan az olduğu tespit edilmiştir. Etanol ekstresi çıkarılan Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktiviteleri araştırılırken,  $\alpha$ -tokoferol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks referans antioksidan bileşikleri olarak kullanıldı.

**2012, 81 sayfa****Anahtar Kelimeler:** Sakkı elması, *Malus communis* L., Antioksidan aktivite, Metal indirgeme.

**ABSTRACT**

Master Thesis

**COMPARISON OF THE ANTIOKSIDANT ACTIVITIES OF FRUIT AND SEED PARTS OF SAKKI APPLE (*Malus communis* L.)**

Mehmet MORTAŞ

Erzincan University  
Faculty of Sciences and Arts  
Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Taha Abdülkadir ÇOBAN

This study is aimed at examine the antioxidant activities of fruit and seed parts of Sakki Apple (*Malus communis* L.). For this purpose, the plants were collected in Üzümlü which is a town of Erzincan province, and they were dried and ethanol extractions were prepared. On prepared ethanol extraction total antioxidant activity was determined by ferrocyanate reduction method;  $\text{Cu}^{2+}$  and potassium ferric thiocyanate were determined by Cuprac method; was determined by reduction method capacity of  $\text{Fe}^{3+}$  ions; the activitiy of scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was determined; the total amount of the compounds of phenolic and flavonoid was determined. It was observed that  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  concentrated of ethanol extracts obtained from fruit and seed parts of Sakki Apple inhibited the lipid peroxidation of linoleic acid emulsion as 69.93 % and 70.70 % respectively. In the same concentration,  $\alpha$ -Tocopherol and trolox caused inhibitions of 85.30 % and 83.10 %, respectively. Total phenolic content were found to be a seed part of the plant more than fruit, the fruit was higher than total flavonoid content. Fruit of the nucleus close to each other, although a slightly higher metal reducing and removal of DPPH activity was observed at the standards.  $\alpha$ -tocopherol and an analoge of its which is the solved in water, namely Trolox were used as reference antioxidant compounds, while the antioxidant activity of fruit and seed parts of Sakkı Apple whose ethanol extract were taken out were being examined.

**2012, 81 pages****Keywords:** Sakkı Apple, *Malus communis* L., Antioxidant activity, Metal reduction.

**TEŞEKKÜR**

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan, maddi manevi ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, değerli Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Taha Abdülkadir ÇOBAN'a her türlü desteğini esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL'a ve katkılılarından dolayı Kimya Bölüm Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca Atatürk Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarında çalışmamızın sağlanmasında ve kimyasal malzeme temininde bizlere göstermiş olduğu yardımlardan dolayı Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı yüksek lisans arkadaşlarım Emrah DİKİCİ, Mesut IŞIK ve Hüseyin KAMBUR' a minnettarım.

Her aşamada yanımda olan ailemin her türlü desteğinden dolayı kendilerine şükranlarımı sunarım.

Mehmet MORTAŞ  
Ağustos, 2012

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ .....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
TABLolar LİSTESİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>38</b>
3.1. Materyal .....	38
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	38
3.1.2. Yararlanılan malzeme, alet ve cihazlar .....	38
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	39
3.1.3.a. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler .....	39
3.1.3.b. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler .....	39
3.1.3.c. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler .....	39
3.1.3.d. Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti tayini ile ilgili çözeltiler .....	40
3.1.3.e. Kuprak metoduna göre idirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..	40
3.1.3.f. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler.....	41
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının toplanması ve kurutulması .....	42
3.2.2. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstraktlarının hazırlanması .....	42
3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini .....	42
3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini .....	43
3.2.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini .....	44
3.2.6. Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti tayini.....	45

3.2.7. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini .....	45
3.2.8. DPPH' serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini.....	46
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>47</b>
4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları.....	47
4.1.1. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları .....	47
4.1.2. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulguları.....	48
4.1.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini bulguları .....	50
4.1.4. Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti bulguları .....	51
4.1.5. Kuprak metodu ile ilgili bulgular .....	52
4.1.6. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi bulguları.....	53
4.2. Tartışma. ....	55
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>62</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>81</b>

**Kısaltmalar**

BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH <sup>•</sup>	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
R <sup>•</sup>	Organik Radikali
ROO <sup>•</sup>	Peroksit Radikali+
RO <sup>•</sup>	Alkoksi Radikali
RS <sup>•</sup>	Tiyil Radikali
RSO <sup>•</sup>	Sülfenil Radikali
RSO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Tiyil Peroksit Radikali
OH <sup>•</sup>	Hidroksi Radikali
IP	İyonizasyon Potansiyeli
TBHQ	Tersiyerbüttilhidrokinon
PG	Propil Galat
POD	Peroksidaz
GSSG-Rx	Glutasyon Redüktaz
GAE	Gallik Asit Ekvivalent
SOD	Süperoksit Dismutaz
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit Radikali
QE	Kuarsetin Ekvivalent
LH	Lipid



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması .....	18
Şekil 1.2. PG (Propil Gallat)'ın molekül yapısı .....	22
Şekil 1.3. BHA (Bütillendirilmiş hidroksi anisol)'ün molekül yapısı .....	22
Şekil 1.4. BHT (Bütillendirilmiş hidroksi toluen)'in molekül yapısı .....	23
Şekil 1.5. TBHQ (tersiyerbütihidrokinon)'nin molekül yapısı .....	23
Şekil 1.6. NDGA (Nordihidroguairatik asit)'in molekül yapısı .....	24
Şekil 1.7. Doğal bir antioksidan olan $\alpha$ -tokoferol ve onun suda çözünen analogu olan troloksun kimyasal yapıları .....	28
Şekil 1.8. Önemli bir antioksidan olan $\beta$ -karotenin yapısı .....	29
Şekil 1.9. $\alpha$ -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi .....	30
Şekil 1.10. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.) .....	34
Şekil 4.1. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan galik asitin açık yapısı .....	47
Şekil 4.2. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için galik asit ile hazırlanan standart grafik .....	48
Şekil 4.3. Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı.....	48
Şekil 4.4. 10-50 $\mu\text{g}$ arasında kuersetin kullanılarak toplam flavonoit bileşik miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği .....	50
Şekil 4.5. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ deki konsantrasyonda toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHT ve troloks ile karşılaştırması.....	51
Şekil 4.6. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan $\alpha$ -tokoferol, troloks ve BHT ile karşılaştırması.....	52
Şekil 4.7. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan $\alpha$ -tokoferol, troloks ve BHT ile karşılaştırması .....	53

Şekil 4.8. Bir antioksidan tarafından DPPH <sup>•</sup> radikalinin giderilmesi .....	54
Şekil 4.9. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/mL) DPPH <sup>•</sup> radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol, troloks ve BHT ile karşılaştırması .....	54

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 1.1. Bazı önemli reaktif oksijen türleri .....	9
Tablo 1.2. Bazı önemli reaktif azot türleri .....	10
Tablo 5.1. Sakkı Elması ( <i>Malus communis</i> L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının 1 mg'da bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının ekivalent olarak miktarları .....	62

## 1. GİRİŞ

Serbest radikallerle ilgili ilk çalışmalar 1800'lü yılların ortalarından itibaren yapılmaya başlanmıştır. Daha sonraki serbest radikaller ile ilgili çalışmalarda Gomberg'in 1900'lü yıllarda trifenilmetil radikalinin ( $\text{Ph}_3\text{C}^{\bullet}$ ) varlığını ispatlamasıyla serbest radikallerin varlığı ortaya konmuştur. Wurtz, sodyum ile metil iyodür ve sodyum ile etil iyodürü reaksiyona sokarak, kimyasal formülleri metil ve etil radikallerine benzer bileşikler bulmuştur. Serbest radikal zincir mekanizmaları Haber ve Willstatter tarafından ortaya konulmuştur. Hey ve Waters birçok organik reaksiyon için serbest radikal mekanizmalarını açıklamaya çalışmışlardır (Huysen, 1970). Yağların depolanırken bozulmasının oluşturduğu sorunlar bilim adamlarının serbest radikallere olan ilgisini artırmıştır (Gutteridge and Halliwell, 1990). Daha sonra bu bileşiklerin biyolojik sistemlerde ve bazı hastalıkların patolojisinde etkileri olduğu bulunmuştur (Southorn and Powis, 1988b). 1968'de McCord and Fridovich'in süpreoksit dismutaz enzimini keşfi ile radikallerin spesifik enzimlerle katalitik olarak uzaklaştırılabileceği görülmüştür (Fridovich, 1986; McCord, 1969). Günümüzde serbest radikal reaksiyonlarının, hastalıklardaki, biyolojideki, toksikolojideki ve yiyeceklerin bozulmasındaki rolleri anlaşıldıkça radikallere olan ilgi artmaktadır (Aruoma, 1998).

Vücudumuz normal fonksiyonları için enerji üretirken, her saniye milyonlarca serbest radikal oluşmasına neden olur. Çevre kirliliği, kimyasal maddeler, petrokimya ürünleri, sanayi atıkları, ilaçlar, güneşin UV ışınları, ozon kozmik ışınlar, X-ışınları, virüsler, enfeksiyon, stres, sigara dumanı ve otomobil egzoz gazları gibi pek çok etken vücudumuzdaki serbest radikallerin sayısını sürekli olarak ve tahmin edemeyeceğimiz kadar artırır. Radikaller mitokondriyal elektron transport zinciri, ksantin oksidaz, siklooksijenaz, vs. olarak üretileceği gibi, dışarıdan alınan ilaçlar ve ksenobiyotikler gibi maddeler tarafından da meydana getirilebilirler (Yavuzer, 1993). Modern gıdalar, yüksek şeker, yağ miktarı yüksek gıdalar, alkol ve hatta yoğun egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber vücudumuzdaki serbest radikallerin miktarının artmasına neden olmaktadır.

Serbest radikaller; membran yapılarında bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitlerini peroksidasyona uğratarak membran bütünlüğünün bozulmasına, proteinlerin denatürasyonuna, çapraz bağlarla agregasyonlarına veya parçalanmaları suretiyle aktivite kaybına, karbohidrat polimerlerinin yıkılmasına, in vivo olarak glikozaminoglikanlar ve hiyaluronik asidin depolimerizasyonuna sebep olurlar. Ayrıca DNA ile reaksiyona girerek istenmeyen mutasyonlar oluşturabilirler (Cheeseman and Slater, 1993). Serbest radikaller; birçok hastalıkla ilişkili olması ve bu hastalıklar eşlik eden çeşitli komplikasyonların ortaya çıkışında merkezi rol oynaması dolayısıyla son yıllarda araştırmacıların ilgi alanı haline gelmiştir. Özellikle vücutta oluşan oksijen radikallerinin kalp hastalıkları, Alzheimer, Parkinson, serebrovasküler rahatsızlıklar, nörosensoryel bozukluklar, katarakt ve romatoid artrit gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir. Yaşlanma sürecinde gözlenen cilt kırışıkları, böbrek fonksiyonlarında azalma ve otoimmün hastalıklara yatkınlığın artması gibi belirtilerde serbest radikallerin ana faktör olduğu düşünülmektedir (Cross *et al.*, 1987).

Reaktivitelerinden dolayı düşük konsantrasyonlarda ( $10^{-4}$ - $10^{-9}$  M) bulunan serbest radikaller oluştuğu yerden uzağa gidemezler. Diğer kimyasal yapılar gibi serbest radikallerin reaktiviteleri de sıcaklıkla ve çevrelerindeki moleküllerin konsantrasyonuyla değişmektedir (Southorn and Powis, 1988a; Huyser, 1970; Pryor, 1976; Slater, 1984). Radikallerin aktiviteleri farklılık göstermesine rağmen, genellikle radikal olmayan türlerden daha az kararlıdır. En basit serbest radikal, bir proton ve bir elektron ihtiva eden hidrojen atomudur. Hemen her radikal türü diğer bir radikali veya molekülü farklı bir mekanizma ile etkileyebilir. Bu reaksiyonların hızı ve seçiciliği, radikalın yüksek konsantrasyonda olmasına, radikalın tek elektronunun yer değiştirmesine (bu radikalın yaşam süresini arttırmaktadır) ve radikalın etkileşime geçeceği molekülde zayıf bağların bulunmasına bağlıdır. Radikaller bir kez oluştuğundan sonra diğer radikallerle veya diğer moleküllerle değişik etkileşimlerle reaksiyona girebilmektedirler (Aruoma and Halliwell, 1987).

Antioksidanların öyküsü serbest radikallerle başlar. Antioksidanlar serbest radikallerin olumsuz etkilerini durduran veya yok eden maddelerdir. Antioksidanlardan önce serbest radikallerin nasıl oluştukları ve etki ettikleri üzerinde durulması gerekir. Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşurlar. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup; çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Bu nedenle elektronların çekirdek etrafındaki yeri tam olarak tarif edilemez, yalnızca bulunma olasılığının en fazla olduğu yerden bahsedilebilir. Belirli elektronların bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer “orbital” olarak adlandırılır. Her orbital zıt spinli olmak üzere iki elektron içerebilir. Sayılarına göre, farklı enerji seviyesindeki elektronlar, farklı orbitalleri doldururlar. Çekirdekten uzaklaştıkça elektronların enerji seviyeleri artar. S orbitalleri çekirdek etrafında ve küresel; p orbitalleri elipsoid; d ve f orbitalleri ise karmaşık geometrik şekillerdedirler. Atomların çekirdeğinin çevresindeki elektronların bulunduğu birinci yörünge bir tane s orbitali (1s), ikinci yörünge s ve p (2s, 2p), üçüncü yörünge s, p,d (3s, 3p, 3d) ve dördüncü yörünge s, p, d, f (4s, 4p, 4d, 4f) orbitallerini içerir. Bir atomda hangi yörüngelerin bulunduğu, orbitallerin ne kadar elektron içerdiği ve orbitallere elektronların nasıl dağıldıkları atom türüne bağlı olarak değişir (Kılınç, 2002).

Kuantum kimyasına göre bir bağın yapısına ancak iki elektron girebilir. Ayrıca bu iki elektronun ters spinli olması gerekir. Yani elektronlardan biri saat yönünde dönerken diğeri tersi yönde döner. Bu şekilde bir araya gelmiş elektron çiftleri oldukça kararlıdır ve insan vücudunda neredeyse tüm elektronlar elektron çifti halinde bulunur. Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırır. Serbest radikaller, en dış orbitalinde bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan, atom, atom grupları veya moleküllerdir (Slater *et al.*, 1987).

Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü artırdığı için,

radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapılu bir organik molekül olabilir. Elementlerin bir kısmı, atomik yapılarında paylaşılmamış elektron içerdiklerinden, doğada atomları şeklinde değil; moleküller şeklinde bulunurlar. Örneğin hidrojen, karbon, nitrojen, oksijen ve diğer bazı elementler doğada atomlar şeklinde serbest bulunmazlar. Asal gazlar gibi elementlerde ise içerebildikleri bütün orbitalleri elektronlarla doyurulduğu için çok kararlı bir yapıya sahip olup serbest atom şeklinde bulunabilirler ve reaktiviteleri yoktur (Kılınç, 2002).

Bir bileşik üç şekilde serbest radikal haline gelebilir. Bunlardan birincisi, radikal olmayan atom veya molekülün bir elektron kazanmasıyla ikincisi, radikal olmayan atom veya molekülden bir elektron kaybıyla üçüncüsü ise bileşikteki kovalent bağın simetrik kırılması sonucu iki yapının birer elektron kazanmasıyla serbest radikal haline geldikleri homolitik bağ kırılmasıyla gerçekleşmektedir (Gutteridge and Halliwell, 1994; Southorn and Powis, 1988a).

Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte aynı atoma katılır ya da ayrılarak biri bir atoma, diğeri öbür atoma katılır. Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa serbest radikaller oluşur. Serbest radikalleri oluşturan bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapar. Bir serbest radikal, çift halde bulunan elektronların çoğunu birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Bu süreçte serbest radikal kendine bir elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektronsa yeni bir serbest radikal oluşturur (Gümrükçüoğlu, 2002).

Sonuçta serbest radikal etki ettiği atom ya da molekülü serbest radikal yapar. Bununla beraber eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Serbest radikaller yaşam için de gereklidirler, elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde görev alırlar (Nelson and Cox, 2004; Gülçin, 2007). Serbest radikaller kısa ömürlü moleküllerdir, ancak yapılarındaki kararsızlık nedeni ile çok aktif yapıları olduklarından tüm hücre

bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedirler (Southorn and Powis, 1988a). Bu yapılar başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girebilirler. Bu etkileşimler sonucunda oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir (Çavdar vd., 1997). Reaktif oksijen türleri ve diğer türevleri reaktivitesi yüksek moleküllerdir. Proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek fonksiyon azalmasına ya da bu maddelerin yok olmasına sebep olabilirler. Bu etkilerinden dolayı bunlara reaktif oksijen türleri (ROS, Reactive Oxygen Species) denmektedir (Halliwell, 1996).

Reaktif oksijen türlerinin oluşma kaynakları iç kaynaklı olarak elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik proseslerken, UV ışınları, radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, yanlış beslenme, kanserojen maddeler en önemli dış kaynaklarıdır. Bunlar serbest radikallerin endojen ve ekzojen kaynakları olarak bilinir (Aksoy, 2002). Oksijen insanların hayatlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir moleküldür. Fakat oksijenin eksik indirgenmesi sonucu hücreye zarar veren ROS oluşmaktadır (Davies, 2000).

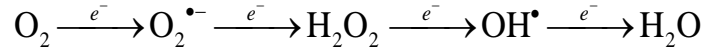
ROS, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $^1\Delta_g \ ^1O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi yapılardır. ROS, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ( $R^{\cdot}$ ), peroksit radikalleri ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoksi radikalleri ( $RO^{\cdot}$ ), tiyil radikalleri ( $RS^{\cdot}$ ), sülfenil radikalleri ( $RSO^{\cdot}$ ), tiyil peroksit radikalleri ( $RSO_2^{\cdot}$ ) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Dawn *et al.*, 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis and Ashwood, 1999).

ROS insan vücudunda normal metabolik prosesler sonucunda sürekli olarak üretilmektedir (Langseth, 1995). Birçok fizyolojik processte önemli bir rol oynayan ROS, vücuttaki birçok oksidatif biyokimyasal reaksiyonun başlıca yan ürünü olduğu ve biyolojik moleküllere etki ederek çeşitli hastalıklara neden olan hücre ya da doku

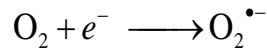


hasarına yol açtığı bilinmektedir (Whitehead *et al.*, 1992; Hoffmann and Garewal, 1995; Yen and Chen, 1995).

Organizmada oluşan serbest radikallerin büyük çoğunluğu oksijenle ilgili serbest radikallerdir. Memeliler hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondrial elektron transport sisteminde, oksijenin yüksek indirgeme potansiyeline sahip dört elektronunun su (H<sub>2</sub>O) oluşturmak üzere elektron transport sistemi ile moleküler oksijene (O<sub>2</sub>) alınmasıyla elde ederler. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşmez ve ara ürün olarak serbest oksijen radikalleri ve bunların da çeşitli reaksiyonları ile reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir (Akkuş, 1995). Bu ürünler çok reaktif yapıdadır ve biyomoleküllerin yapılarına girerek geri dönüşümsüz hasarlara sebep olurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Bu reaktif oksijen türleri ve oluşum reaksiyonları aşağıda verilmiştir.



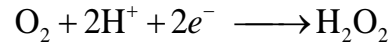
Süperoksit Radikali; Soluduğumuz oksijen iki radikalli, iki tek elektron içeren ve çok stabil olan bir moleküldür, bir dış enerji kaynağı sayesinde bir elektron kazanmakla serbest elektronlarından birisini negatif yük elde ederek çift konuma getirebilir. Bu molekül süperoksit anyonudur (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)



Sitoplazmadaki O<sub>2</sub><sup>•-</sup>'nin başlıca kaynağı endoplazmikretikulumdaki sitokrom P<sub>450</sub> sistemidir (Grisham and McCord, 1986; Halliwell *et al.*, 1987). O<sub>2</sub><sup>•-</sup>'nin kimyasal davranışı, içinde çözündüğü ortama göre değişmektedir. Sudaki reaktifliği oldukça azdır ve sulu çözeltilerde daha çok indirgeyici ajan gibi davranmaktadır. Bunun aksine, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> organik çözücülerde oldukça reaktif olup çok tehlikeli bir hal alabilmektedir. Özellikle biyolojik membranların iç kısmında meydana geldiğinde,

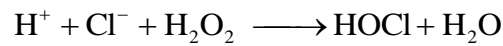
önemli hasarlar verebilmektedir (Birnoim and Kanabus-Kaminska, 1985; Gutteridge and Halliwell, 1994).  $O_2^{\cdot-}$  molekülü tekrar  $O_2$  molekülü olabilmek için kendi elektronunu başka bir süperoksit anyona transfer eder. Böylelikle,  $O_2$  molekülü ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) molekülü oluşmaktadır. Genellikle,  $O_2^{\cdot-}$  molekülünün, fazla toksik olmadığı ancak daha reaktif oksijen kökenli metabolitler için prekürsör olduğu kanısı mevcuttur (Porter, 1984; Southorn and Powis, 1988a; Grisham and McCord, 1986).

Hidrojen Peroksit; proton içeren ortamlarda  $O_2^{\cdot-}$ , molekülünün ömrü kısadır,  $O_2^{\cdot-}$ , molekülü tekrar  $O_2$  molekülü olabilmek için kendi elektronunu başka bir süperoksit anyona transfer eder. Böylelikle,  $O_2$  molekülü ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) molekülü oluşmaktadır



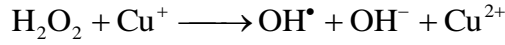
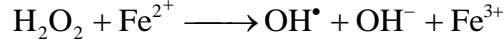
$H_2O_2$ , ortaklanmamış elektronları olmadığı için serbest radikal değildir. Ancak bir elektron aldığı anda hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşturmaktadır. Bu elektronu belirli metal iyonlarından alır (Aruoma and Halliwell, 1987; Gutteridge and Halliwell, 1994; Halliwell and Clement, 2000).  $H_2O_2$ , membranlara serbestçe girmekte ve oluştuğu yerden çok uzaklara gidip hücre kompartımanları boyunca ve hücreler arasında serbest radikal indüklü hasarı iletmektedir (Yokozawa *et al.*, 1998; Young and Woodside, 2001).

Ayrıca  $H_2O_2$  reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Asad *et al.*, 2004).

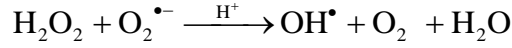


Hidroksil radikali; Lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok güçlü bir şekilde saldırarak oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakan ve yarı ömrü  $10^{-9}$  saniye gibi çok kısa olan bir reaktif oksijen türüdür.  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  indirgenmesi sonucunda açığa çıkar. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir (Fantal, 1996; Halliwell, 2000; Nordberg and Arner, 2001).

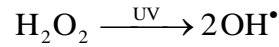
Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



Ayrıca hidrojen peroksitin UV ışınlarının etkisiyle  $\text{OH}^\bullet$  dönüştüğü bilinmektedir.



$\text{OH}^\bullet$  radikalinin *in vivo* oluşumu en az dört mekanizma ile meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar; geçiş metal iyonları katalizi, arka plan (background) radyasyonuna maruz kalma,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin  $\text{NO}^\bullet$  ve  $\text{HOCl}$  ile reaksiyonudur ( Halliwell, 1995).

Nitrit Oksit; bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar

gevşemesini uyarır. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein

reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, oluşmuş olan ROS'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmakta ve bunun da ileri dekompozisyonla HO<sup>•</sup> radikali oluşumuna yol açmaktadır (Southorn and Powis, 1988a; Cochrane, 1991).

Singlet Oksijen; enerji verilmek suretiyle meydana gelebilen oksijenin oldukça reaktif şekli ( $O_2^{\uparrow\downarrow}$ ) olarak bilinmektedir. Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde ROS'leri arasında yer alan serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir (Grisham and McCord, 1986; Southorn and Powis, 1988a).

Hücrel koşullarda önemli miktar ve çeşitlilikte serbest radikal üretilir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Bu radikal ve reaktif türlerden bazıları Tablo 1 ve Tablo 2 de gösterilmiştir (Halliwell and Auroma, 1998).

**Tablo 1.1.** Bazı önemli reaktif oksijen türleri

<b>Radikaller</b>	<b>Formülü</b>	<b>Nonradikaller</b>	<b>Formülü</b>
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
Hidroksil	$OH^{\bullet}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksi	$ROO^{\bullet}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksi	$RO^{\bullet}$	Ozon	$O_3$
Hidroperoksi	$HOO^{\bullet}$	Singlet oksijen	$^1\Delta_g \ ^1O_2$

**Tablo 1.2.** Bazı önemli reaktif azot türleri

<b>Radikaller</b>	<b>Formülü</b>	<b>Nonradikaller</b>	<b>Formülü</b>
Nitrik oksit	NO <sup>•</sup>	Nitröz asit	HNO <sub>2</sub>
Azot dioksit	NOO <sup>•</sup>	Nitrozil katyonu	NO <sup>+</sup>
		Nitroksi anyonu	NO <sup>-</sup>
		Diazot tetraoksit	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
		Peroksinitrit	ONOO <sup>-</sup>
		Peroksinitröz asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
		Alkilperoksi nitritler	ROONO

Serbest radikallerin aşırı oluşumu metabolizma için tehlike oluşturur. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücudun hastalıklara karşı direncini, vücudu saran organizmaları yok ederek arttırır. Buna karşın fazla üretildiğinde metabolik hasara neden olarak birçok hastalığa yol açar. Serbest radikallerin hücrelerde protein, lipid, karbohidrat ve nükleik asitler üzerinde önemli etkileri vardır (Loecke, 1999).

ROS tarafından en fazla etkilenen molekülün, hücre membranının ana bileşeni olan lipidler olduğu düşünülmektedir. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekül varlığında lipid peroksidasyonu kolaylıkla başlar. Oksijenin sebep olduğu lipid oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur (Aruoma and Cuppett, 1997).

Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları için de önemlidir (Davies, 2000). Ayrıca zamanla arterlerde yağ birikmesi sonucu bu kısımların daralması ve sertleşmesi olayı olarak bilinen aterosklerozisin gelişmesinde lipid

peroksidasyonunun etkisi oldukça büyüktür (Devaraj and Jialal, 1998; Kaul *et al.*, 2001; Heinecke, 2002).

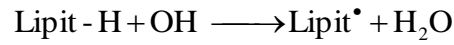
Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır. Lipit peroksil radikalleri (süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali) lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır (Kneepkens, 1994; Loecke, 1999).

Serbest radikaller, hücre zarındaki lipitlerden birine saldırdığında lipit molekülü değişime uğrar. Lipitler vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları da zarara uğrar. Bunun sonucunda hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz, oluşan ürünlerin atılmasını düzenleyemez (Floyd, 1990; McCord, 1985). Serbest radikallerin etkileri üzerindeki araştırmaların en kapsamlısı ve en iyi tanımlanmış etkileri lipitler üzerindedir. Çünkü yağ asitleri radikallerden hızlıca etkilenebilen, kolay ulaşılan bir hedef durumundadır. Lipitlerde ki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu radikal zincir reaksiyonuna sebep olur. Lipitlerin peroksidasyonu karbonil ve alken gibi hücrelere zararlı birçok bileşiğin oluşmasına yol açar (Kneepkens, 1994; Loecke, 1999).

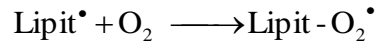
Lipit peroksidasyonu, başlama, ilerleme ve sonlanma olmak üzere üç safhalı bir reaksiyon zinciridir. Bir membranda lipit peroksidasyonunun başlaması, bir hidrojen atomu kopartacak reaktivitesi olan herhangi bir reaktif türle gerçekleşebilmektedir. Hidrojen atomunun koparılmasından sonra, hidrojen atomunun tek bir elektronunun olmasından dolayı karbon atomunda ortaklanmamış bir elektron kalmaktadır. Çoklu doymamış yağ asit'indeki karbon radikali, moleküler bir düzenlenme geçirerek bir konjuge dien oluşturmaktadır. Bu da O<sub>2</sub> ile çabucak reaksiyona girerek bir hidroperoksi radikali oluşturmaktadır. Bu radikal diğer lipit moleküllerinden hidrojen atomları koparmakta ve böylece lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonları devam

etmektedir. Hidroperoksi radikali bir hidrojen atomu ile birleşerek bir lipit hidroperoksit oluşturmaktadır. Aşağıdaki reaksiyonlar söz konusu olayları göstermektedir ( Halliwell and Gutteridge, 1984).

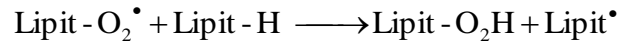
Yağ asitlerinin oksidasyonu metilen karbonundan hidrojen atomunun çıkarılması ile başlar ve yağ asidi radikali (L<sup>•</sup>) oluşur.



İlerleme aşamasında yağ asidi radikaline hızlı bir şekilde oksijen eklenerek peroksil radikali (LOO<sup>•</sup>) oluşur. Lipit peroksil radikalleri zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır.



Bunlar diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatırlar. Sonlanma aşamasında ise lipit hidroperoksitler yıkılarak daha reaktif radikal türleri oluşturur. Moleküler düzenlemeden sonra



Peroksi radikalleri ayrıca siklo endoperoksitleri de oluşturabilmektedir. Ortamda bulunan demir ve bakır tuzları lipid hidroperoksitlerin yıkılımını hızlandırır ve oluşan peroksi ve alkoksi radikaller ise lipit peroksidasyonlarını uyarırlar (Kneepkens, 1994; Loecke, 1999).

Lipit peroksidasyonu, hayvan hücre, doku ve vücut sıvılarında yaşla birlikte, hastalık durumlarında ve toksinlerin uygulanmasından sonra artmaktadır (Halliwell and

Gutteridge, 1984). Lipit peroksidasyonunun ateroskleroz, romatoid hastalıklar, kardiyak ve serebral iskemiler, birçok karaciğer hastalığı, belli metallere, çözücülerle, pestisitlerle ve ilaçlarla toksisitede alakalı olduğu bildirilmiştir (Wong *et al.*, 1987).

Lipit peroksidasyonu sonucunda aldehytler, hidrokarbon gazları ve malondialdehit (MDA) gibi çeşitli kimyasal rezidüer ortaya çıkmaktadır. Bu yıkım ürünleri, zincir reaksiyonunun meydana geldiği yerden uzaklara difüze olabilmekte (Southorn ve Powis, 1988a) ve istenmeyen etkilere neden olabilmektedirler. Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin bir göstergesi olarak kullanılır.

Proteinler de lipitler gibi oksidatif hasardan etkilenirler. Proteinlerin oksidasyonu genellikle OH<sup>\*</sup> tarafından başlatılır ve sürecin seyri oksijen, süperoksit ya da onun protonlanmış hali olan HO<sub>2</sub><sup>\*</sup> tarafından belirlenir (Berlett and Stadtman, 1997). Diğer reaktif türler de protein oksidasyonunda yer alabilirler (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidülerinin yan zincirlerini de oksitleyebilir. Bu şekilde istenmeyen protein-protein etkileşimleri oluşabilir ve proteini parçalayabilecek şekilde protein iskeletini oksitleyebilirler. Benzer oksidatif hasarlar serbest geçiş metal iyonlarının varlığında da meydana gelmektedir (Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman, 2002).

Özellikle protein yan zincirlerinde bulunan prolin, arginin, lisin ve treonin amino asitleri oksitlendiği zaman aldehytler ve ketonlarda olduğu gibi karbonil grupları oluşur ve bu gruplar kimyasal olarak kararlıdır (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Ayrıca kanser çeşitleri, parkinson ve alzheimer gibi birçok dejeneratif hastalığın DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Evans *et al.*, 2004).



Proteinlerin karbonil türevleri ve oksidasyon ürünleri amino asit yan zincirlerinin modifikasyonuna sebebiyet vermektedir. Proteindeki karbonil gurupları serbest radikallerin açık hedefi durumundadır. Serbest radikaller peptit bağlarını koparabilir, hücre membranında bulunan proteinleri yıkararak hücrenin ölümüne sebep olabilirler. Enzimler de protein yapısında olduğu için serbest radikallerden etkilenerek fonksiyonları bozulabilir. Örneğin hücredeki iyon transportunu bozarak hücrenin membran potansiyeline hasar verebilirler (Loecke, 1999).

Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi) ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Shacter, 2000). Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (Berlett and Stadtman, 1997). ROS ile protein ana yapısının reaksiyonu, amino asit  $\alpha$  karbonundan bir H atomunun  $\text{OH}^\bullet$ 'e bağlanarak ayrılması ve  $\text{H}_2\text{O}$  oluşturması ile başlar (Stadtman and Levine, 2003). Her ne kadar  $\text{OH}^\bullet$ 'in majör kaynağı fizyolojik şartlar altında  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin demir veya bakır aracılığı ile ayrılması olsa da aynı reaksiyonlar iyonize radyasyon sonucu oluşan  $\text{OH}^\bullet$  ve  $\text{HO}_2^\bullet$  ile de gerçekleşmektedir. H atomunun  $\text{OH}^\bullet$ 'ne bağlanarak ayrılması karbon merkezli radikalın oluşumuna neden olur. Oluşan bu radikal, oksijen varlığında hızlı bir şekilde peroksil radikaline dönüşür. Peroksil radikali de kolaylıkla süperoksit radikalinin protonlanmış formu veya başka bir molekülden H atomu alarak alkil peroksite dönüşür. Alkil peroksit ise  $\text{HO}_2^\bullet$  ile daha ileri bir reaksiyonla alkoksil radikaline ve daha sonra da alkoksil radikali yine  $\text{HO}_2^\bullet$  ile hidroksi türevine dönüşür (Stadtman and Levine, 2003).

Reaksiyonlar karbon merkezli radikale oksijenin eklenmesine bağlıdır. Oksijenin varlığında ilerleyen bu ileri reaksiyonlar  $\text{HO}_2^\bullet$  dışında  $\text{Fe}^{+2}$  aracılığı ile de gerçekleşebilmektedir. Eğer oksijen yoksa karbon merkezli radikal karbon-karbon çapraz bağlı türevleri üretmek üzere bir başka karbon merkezli radikal ile reaksiyona girebilir. Bu yoldaki alkil, alkil peroksil ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı ya da

başka protein molekülündeki diğer amino asit rezidüleri ile yan reaksiyonlara girerek yeni bir karbon merkezli radikal oluşturabilirler (Stadtman and Levine, 2003).

Proteinler birçok farklı mekanizma ile okside olabildiklerinden birden fazla protein oksidasyon türü vardır (Shacter, 2000). Proteinlerin oksidatif modifikasyonları için genel kabul gören bir sınıflandırma şeması yoktur. Ancak protein oksidatif modifikasyonu, oksitlenen rezidünün ve oluşan ürünün özelliğine göre iki gruba ayrılabilir (Levine, 2002).

**Global Modifikasyon:** Birden çok rezidünün değiştiği ve birden çok ürünün olduğu modifikasyonlardır. Karbonil gruplarının oluşumu bu tür modifikasyonun bir örneğidir.

**Spesifik Modifikasyon:** Hem oksitlenen rezidünün, hem de oluşan ürünün oldukça spesifik olduğu modifikasyonlardır. Ditirosin oluşumu bu tip modifikasyonun bir örneğidir.

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda farklı şekillerde meydana gelir. Bazıları biyokimyasal döngü içerisinde olmaması gereken kimyasal reaksiyonlar neticesinde oluşur. Örneğin; süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, mitokondrial ve stokrom P<sub>450</sub> elektron transport zincirlerinin bileşikleri gibi bazı biyomoleküllerin oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir (Fridovich, 1986; Halliwell, 1994).

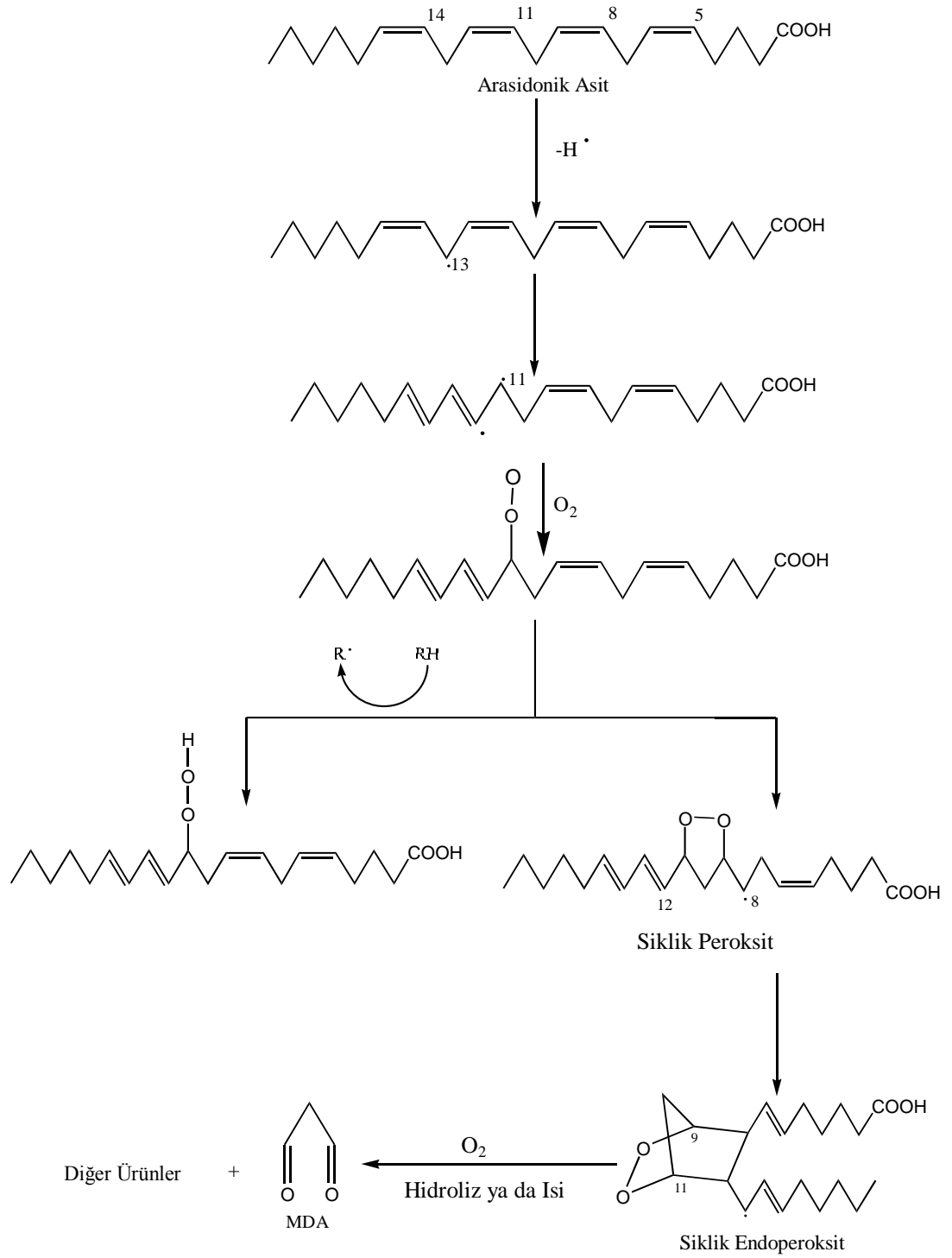
Ayrıca insanlar çoğu zaman farklı kaynaklardan radyasyona maruz kalmaktadır. Böyle durumlarda düşük dalga boyundaki elektromanyetik ışınlar suyu parçalayarak reaktif hidroksi radikallerini oluşturabilir (Von Sonntag 1987). Su, enerjiye maruz bırakıldığı zaman  $10^{-16}$ 'sında uyarılmış hale (H<sub>2</sub>O)\* geçer. Böylece bir sulu çözeltinin uyarılmasıyla üç farklı radikal oluşur. Bunlar hidrojen radikali (H<sup>•</sup>) ve hidratlaşmış elektron (e<sup>-</sup><sub>aq</sub>) dur (Halliwell and Gutteridge 1989). Reaktif oksijen türleri canlı

organizmada sigara içilmesi durumlarında olduğu gibi dışarıdan da alınabilir. Sigara dumanının ana bileşiği  $\text{NO}_2^{\bullet}$  dir.  $\text{NO}_2^{\bullet}$  'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikallerin olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak da serbest radikal üretimini artırabilir (Papas, 1996). Oksidasyon prosesi, radikalik zincir reaksiyonları vasıtasıyla meydana gelir. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparabilirler. Radikallerin bu özellikleri, onlara kimyasal aktiflik sağlar. Radikallerin organizmada kontrolsüz bir şekilde varlığı, biyomolekülerin modifikasyonuna sebep olur. Hayatımızın vazgeçilmez bir ögesi olan oksijen gazının da bir diradikal olması aerobik canlılar için bir dezavantajdır. Bu sebeple aerobik canlılarda biyolojik sistem oksidasyona doğru giderken, oksidasyon önleyici veya geciktirici sistemler oksidasyonu durdurma veya yavaşlatma yönünde hareket ederek sürekli bir denge oluştururlar. Gıda maddeleri özellikle de yağ ihtiva eden ürünler, işlenme ambalajlanma esnasında oksijenden uzak tutulmakta ya da antioksidanlar aracılığı ile oksidasyondan korunmaya çalışılmaktadır. (Ak, 2006).

Normalde organizmada oluşan serbest radikallerle bunlara karşı savaş veren antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge söz konusudur. Bu denge, serbest radikaller lehine bozulduğu zaman oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres, hücre hasarına ve ölümüne neden olabilmektedir (Aruoma, 1998). Hücrede ROS ve RNS'nin aşırı miktarda oluşmaları "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Bu olay, tüm hücre bileşenleri (karbonhidratlar, proteinler, yağlar) üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Aynı zamanda  $\text{OH}^{\bullet}$  başta olmak üzere birçok serbest radikal, genetik materyal olan DNA'daki nükleik asit bazlarının değişimine ve DNA zincirinde kırılmalara neden olarak kanser oluşumu, hücre yaşlanma ve hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatabilirler (Boğa, 2007). Olumsuz etkilenen bu sistemler, diğer periferik sistemleri de etkiler. Bu durum antioksidan sistem tarafından sonlandırılıncaya kadar zincirleme olarak devam eder. Aksi durumda bu reaktif türler hücrenin doğrudan ya da dolaylı olarak ölümüne sebep olur (Moldovan, 2004).

Serbest radikallerin zararlarının engellenmesinde antioksidanların rolü; aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri temizleyerek oksidasyonun tetiklediği hasarları hücresel bazda engellemek, dolayısıyla dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerini gidererek onların zararlı etkilerini engelleyen moleküllerdir (Halliwell, 1996; Stadtman, 2002).

Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otookside olabilen madde, oksijenle birleşmektedir. Bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksit radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer molekülerine aktarmaktadır. Böylelikle besinlerdeki otooksidasyon devam etmektedir. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu koparıcı rolü oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur (Keskin ve Erkmen, 1987).



Şekil 1.1. Arşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması (Gülçin, 2002).

Antioksidanların etki mekanizması aşağıdaki gibidir;

A. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- a. Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki
- b. Oksijeni uzaklaştırıcı ve konsantrasyonunu azaltıcı etki
- c. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki

B. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- a. Temizleyici (scavenging) etki: ROS'lerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme
- b. Bastırıcı (quencher) etki: ROS'lerj, ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma
- c. Onarıcı (repair) etki
- d. Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROS'lerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki

Dünyada ilk oluşan organizmalar anaeroblardır. O zamanki şartlarda atmosferde oksijen yok denecek kadar az bulunmaktaydı. Mavi-yeşil alglerin hidrojen atomu elde etmek için suyu parçalamaları sonucunda tonlarca oksijen atmosfere salınmıştır. Böylece stratosferde ozon tabakası (O<sub>3</sub>) meydana gelmiştir. Dünyanın atmosferi oksijen bakımından zengin hale geldiğinde, anaerobik yaşam formları ya adapte olmuşlar, ya ölmüşler, ya da oksijensiz yerlere göç etmişlerdir. Adapte olabilenler, antioksidan savunma mekanizmaları geliştirerek, kendilerini oksijenin toksik etkilerinden koruyabilmişlerdir. Aerobik organizmalar değişik tipte antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir (Fridovich, 1978; Gutteridge and Halliwell,

1994). Diyetle alınan antioksidanların yanında organizmada doğal olarak sentezlenen antioksidanlar da vardır. Antioksidan savunma sistemleri, antioksidan enzimler ve antioksidan moleküller olarak ikiye ayrılmaktadır. Antioksidan savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. Bu enzimlerden en önemlileri süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve mitokondriyal sitokrom oksidazdır (Gutteridge and Halliwell, 1994).

Süperoksit dismutaz: Hücre içinde mitokondride doğal olarak bulunan bir enzimdir. Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirirler.



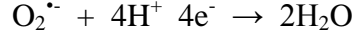
Katalaz: İnsan hücrelerindeki peroksizomlarda bulunurlar. Hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için  $\text{H}_2\text{O}_2$  suya ve moleküler oksijene ayrıştırır.



Glutatyon peroksidaz: Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleüllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Karaciğerde en yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta düşük aktivitede bulunur. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada  $\text{H}_2\text{O}_2$  da detoksifiye edilmiş olur.



Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ( $O_2^{\bullet-}$ ) detoksifiye eder.



Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli devam eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ( $O_2^{\bullet-}$ ) zararlı etkilerine engel olurlar.

Sülhidril proteinleri ve diğer serum proteinleri: Organik peroksitleri ve hidroksil radikallerini zararsız kimyasallara dönüştürürler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

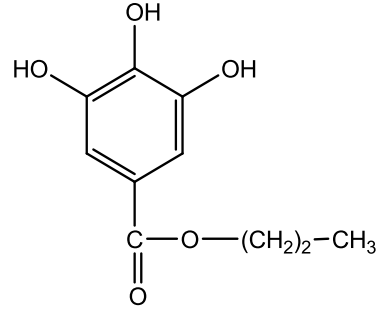
Dış kaynaklı antioksidan maddeler doğal ve sentetik antioksidanlardan oluşmaktadır. Antioksidan moleküller gıdalarda doğal olarak buldukları gibi, gıda sanayisinde gıdaların raf ömrünü uzatmak, ürünlerin kalitesini korumak ve besinsel değerlerini muhafaza etmek amacıyla sentetik antioksidanlar kullanılır. Bu yapılar besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip bir grup kimyasaldır. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Böylelikle yağların, tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Ortamda pek az miktarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir. Bir antioksidanın, besin maddelerinde kullanılmadan önce sağlığa zararı olmadığı kesin olarak saptanmalıdır (Keskin ve Erkmen, 1987).

Gıda maddelerinde, peroksidasyon prosesini geciktirmek veya önlemek ancak antioksidan bileşiklerin ilavesiyle mümkün olmaktadır. Bu ise pahalı bir metottür. Gıda maddelerinin bozulmalarını engellemek için yıllardan beri sentetik antioksidan olarak propil gallat (PG), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş



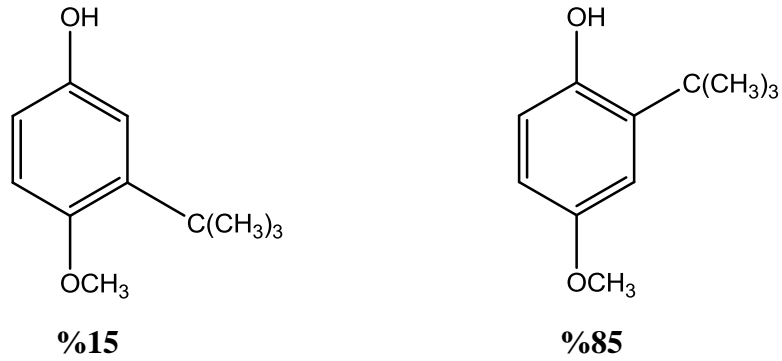
hidroksianisol (BHA), *tersiyer*-bütillidrokinon (TBHQ) ve nordihidroguairatik asit (NDGA) kullanılmaktadır.

PG (propil gallat): Gallik asitin esteri olan ve beyaz renkte katı kristaller halindeki propil gallat, hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok kullanılan sentetik antioksidandır.



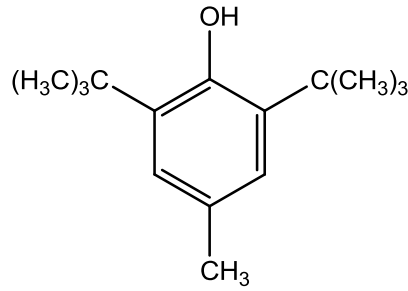
**Şekil 1.2.** PG (Propil Gallat)'ın molekül yapısı

BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol): Bu antioksidan, ticari olarak 3-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (%85) ile 2-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halindedir. Beyaz mumsu katı bir yapıya sahip olup, bitkisel ve hayvansal yağlarda kullanılmaktadır. Bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi, hayvansal yağlardaki etkisine göre daha azdır.



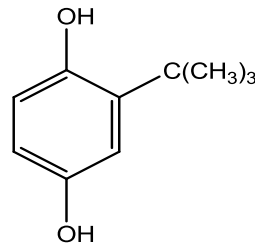
**Şekil 1.3.** BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol)'ün molekül yapısı

BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen): BHT (2,6-ditersiye bütül-4-metil fenol); beyaz renkli kristal yapıdadır. Bu antioksidan da BHA gibi ısıya oldukça dayanıklıdır. Bu yüzden fırında pişirme ve kızartma gibi işlemlerde daha fazla ortamda kalır ve gıdaya dayanıklılık kazandırır. BHA ile sinerjistik etki gösterirken, PG ile göstermez.



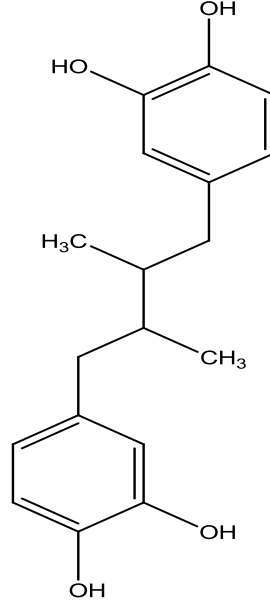
**Şekil 1.4.** BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen)'nin molekül yapısı

TBHQ (tersiyerbütülhidrokinon): TBHQ, beyaz ile açık kahverengi arası renkte kristal yapıda olup bitkisel yağlar için çok etkili bir antioksidandır. Birçok uygulamada diğer antioksidanlara kıyasla en iyi etkiyi gösterdiği belirtilmektedir.



**Şekil 1.5.** TBHQ (tersiyerbütülhidrokinon)'nun molekül yapısı

NDGA (Nordihidroguairatik asit): Bu madde bir çöl bitkisi olan Larrea divaricata'dan doğal olarak ekstrakte edilebildiği gibi sentetik olarak da elde edilebilmektedir. Gri-beyaz kristalimsi bir maddedir. Bu maddenin yağlardaki çözünürlüğü sınırlı (%0.5-1) olup gıdalarda kullanımını ülkemiz dahil diğer birçok ülkede yasaklanmıştır.



**Şekil 1.6.** NDGA (Nordihidroguairatik asit)'in molekül yapısı

Fenolik bileşik olmaları, bunların etkili birer antioksidan olmalarını sağlar. Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar yirminci yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir (Haigh, 1986; Van, 1986). Sentetik antioksidanlar hakkındaki bu şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi artırmış ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıda yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Bunların dışında ürik asit, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, melatonin, laktoferrin, metiyonin, glutatyon ve bilirubin gibi bileşenler de gıdalarda bulunabilen antioksidan özelliğe sahip kimyasallardır (Altınışık, 2000; Günaydın ve Çelebi, 2003). Çoğu araştırmada

meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Miller and Paganga, 1997).

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıl ve baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunur (Foo and Porter, 1981; Namiki, 1990). Antioksidanların en önemlileri fenol grubu içerenler ve bunların dihidroksi türevleridir. Bu yapıların temel örneği hidrokinon olup tersinir olarak kinona yükseltgenir. Fenolün kendisi antioksidan değilken yer değişimli benzenler, birden fazla benzen halkasını içeren aromatik bileşikler veya heterosiklik bileşikler, yapıları *orto* ve *para* hidroksi bileşiklerine benziyorsa antioksidan olabilirler. Polifenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir. Yalnız *orto* ve *para* polifenoller antioksidan özelliğe sahiptir. Örneğin, susam yağında bulunan sesamol bir tek OH grubuna sahip olduğu halde, bu grup oksijenlerden birine göre *para* pozisyonunda olduğundan, antioksidandır (Keskin ve Erkmén, 1987). Bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanabilmesi için iki özelliğe sahip olması gerekmektedir. Birincisi, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilme, yavaşlatma veya önleme yeteneğine sahip olması, ikincisi de kendisi serbest radikale dönüştüğünde stabil bir formda kalabilmesidir (Scalbert *et al.*, 2005; Anıl, 2006).

Bu bileşikler oksidatif düzende farklı şekillerde davranırlar. Örneğin oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri giderici özelliğini kullanarak zincir reaksiyonların başlamasını önlerler, metal iyon katalizörlerini bağlarlar (Shahıdı, 1996). Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenollerini multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu şelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar (Miller and Paganga, 1997). Bitkisel gıdalarda bulunan fenolik maddeler; fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar ve stilbenler gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlardan özellikle fenolik asitler ve flavonoidler antioksidan olarak önem taşımaktadır. Antioksidan davranışlarından dolayı

flavonoidler, diyetle bulunan en önemli antikanserojenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Kim and Lee, 2004; Scalbert *et al.*, 2005; Anil, 2006; Fernandez-Panchon *et al.*, 2008).

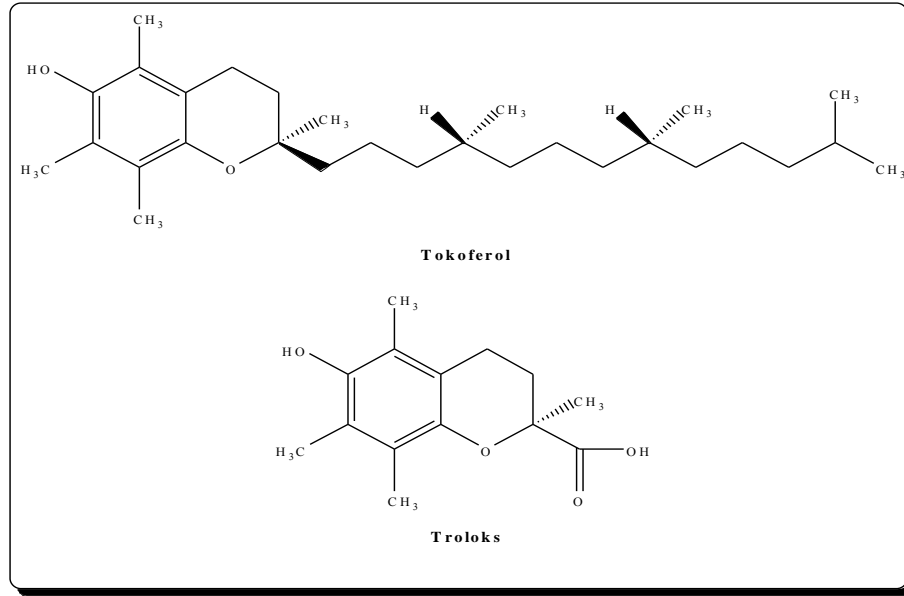
Flavonoidler polifenolik yapıda olup birçok bitki, meyve ve sebze de bol miktarda bulunmaktadır. Son zamanlarda hakkında en çok araştırma yapılan doğal antioksidan gruplarından biridir. Antosiyanin, kateşinler, izoflavonlar ve flavonoller gibi türleri vardır (Hertog *et al.*, 1992). Yapılan araştırmalar sonucunda bu grup antioksidanların başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere daha birçok hastalığın oluşumunun önlenmesinde olumlu etkiler sağladığı tespit edilmiştir (Pratt ve Hudson, 1990). Flavonoidler ve diğer bitki fenollerinin süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), lipid alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ) ve peroksit ( $ROO^{\cdot}$ ), nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu,  $\alpha$ -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimulan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, influenza ve virüslere karşı) etkileri de söz konusudur. Flavonoidler, glikozitler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekerlere parçalanabilirler (Burak ve Çimen, 1999). Fenolik antioksidanlar, lipid radikallere, hızla  $H^+$  vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksi ( $ROO^{\cdot}$ ) ve alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır (Apak vd., 2007).

Doğal fenolik antioksidanlardan bir diğer grubu, tokoferoller yani E vitaminleri oluşturur. Antioksidan özelliği en fazla olan ise  $\alpha$ -tokoferoldür (Keskin ve Erkmen, 1987). E vitamini; bitkiler tarafından sentezlenen, tokoferol ve tokotrienol formlarında bulunan ve yağda çözünen bir antioksidan vitamindir. Bütün klorofil-a içeren dokular ve en başta da kloroplastlar tokoferol içermektedir. Tokoferoller ya da E vitamininde fenolik hidroksil grubu olan aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif bölümünü oluşturmaktadır. Alifatik yan halkası ise apolar olup molekülü suda çözünmez kılmaktadır. E vitamininin bir antioksidan olarak kabul edilmesinin nedeni, bu bileşiğin kolayca okside olarak diğer oksidasyona duyarlı grupların oksidasyonunu engellemesidir. Hayvansal kaynaklarda, en yüksek vitamin E

aktivitesine sahip olan  $\alpha$ -tokoferol daha yüksek oranda bulunurken, bitkilerde diğer tokoferoller ile tokotrienoller yaygındır. Bütün tokoferoller ve tokotrienoller esterleşmedikçe antioksidan aktiviteye sahiptir (Saldamlı ve Sağlam, 1998; Anıl, 2006).

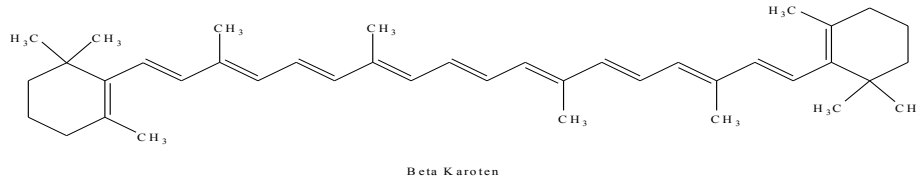
E vitamini aktivitesine sahip 8 farklı tokol bulunmakta; yenebilir yağlar bu tokollerin tümünü veya bazılarını içermektedir. Doğal olarak meydana gelen sekiz tokolden sadece dört tanesi ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -tokoferol) fizyolojik önem taşımaktadır. Bunların en önemlisi ve en etkilisi  $\alpha$ -tokoferoldür (Saldamlı ve Sağlam, 1998; Anıl, 2006). Çünkü bu molekül lipoprotein içine selektif olarak  $\alpha$ -tokoferol transferi yapan spesifik bir taşıyıcı proteine sahiptir. Serbest radikaller vücudun kendi endojen antioksidanlarını tükettiği gibi lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi normal biyomolekülleri de bozarlar. Alfa-tokoferol gibi antioksidanlar, bu hasarları serbest radikalleri ve lipit peroksil radikallerini temizleyerek düzenler (Tüzün ve Garip, 2005).

Vitamin E antioksidan özelliğinden dolayı kolay oksitlenebilen ve böylece çeşitli bileşiklerin oksidasyonunu önleyen bir öğedir. E vitamininin esas işlevi hücre içi membran bütünlüğünün korunması ve hücre membranlardaki fosfolipitlerin içerdiği doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu önlemektir. E vitamini ayrıca sinir ve kas fonksiyonunun korunması ve gelişebilmesi için de önemlidir. Olası işlevleri arasında dişi ve erkek üreme fonksiyonlarındaki organ dejenerasyonunu engelleyici etkileri yer alır. Tokoferollerin antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha yüksektir. Tokoferoller lipit peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek tokoferoksil radikalleri oluşturarak serbest radikalleri giderirler. Başta hücre membranları olmak üzere hücrenin lipit kısımlarını korurlar. Tokoferoller kolesterol oksidasyonunu önleyerek arterosklerozisin önlenmesine katkı sağlarlar (Saldamlı ve Sağlam, 1998; Gök ve Serteser, 2003; Anıl, 2006 ).



**Şekil 1.7.** Doğal bir antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve onun suda çözünen analogu olan troloksun kimyasal yapıları (Köksal, 2007).

Aromatik amino antioksidanlar da genellikle fenollü antioksidanlara benzerler, yalnız hidroksi grupları kısmen veya tamamen amino gruplar ile yer değiştirmiştir. Bunlardan biri para izo butil amino fenol dur (Keskin ve Erkmen, 1987). Bitkilerde ve hayvansal dokularda bulunan kırmızı-sarı pigmentlerdir. Yağda çözünen bileşiklerdir. Karotenoidler sarı ve koyu yeşil renkli sebze ve meyvelerde bulunurlar. Kayısının, kavunun, havucun domatesin renkleri karotenoidlerden kaynaklanır. Karoten, karotendioksigenaz enziminin merkezdeki çift bağı koparmasıyla A vitaminine dönüşür. Gıdalarda bulunan karotenoidler, sekiz izoprenoid biriminin bir araya gelmesiyle oluşan likopen türevi polienlerdir. Karotenoidler, özellikle likopen, güçlü singlet oksijen süpürücü rol oynarlar; hücre ve diğer vücut komponentlerini serbest radikallerin saldırılarından korurlar ve zincir reaksiyonlarını keserler (Durmaz, 2002). Gıdalarda bulunan en önemli karotenoidler  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen, lutein ve  $\beta$ -kriptoksantindir (Can vd., 2005).



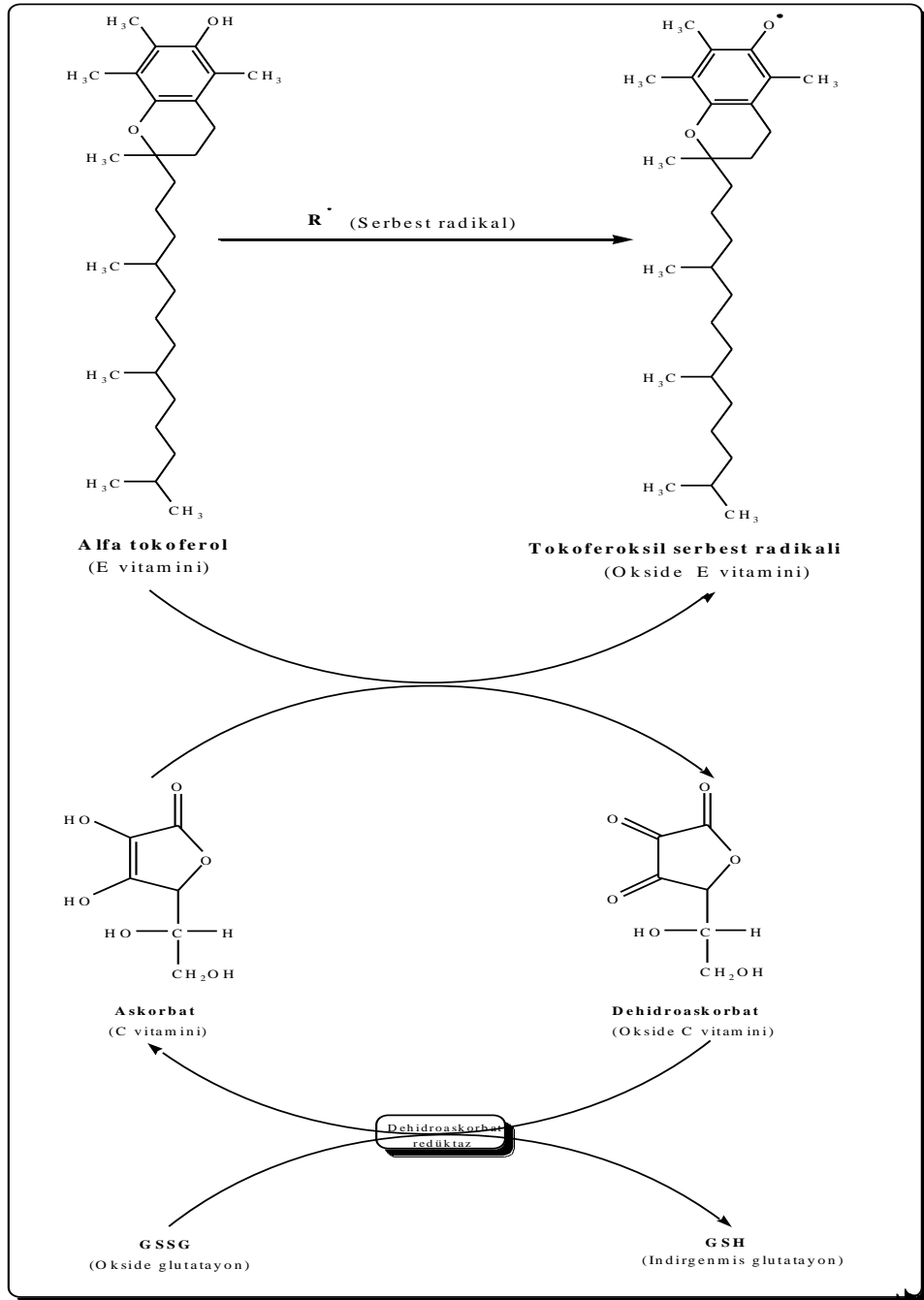
**Şekil 1.8.** Önemli bir antioksidan olan  $\beta$ -karotenin yapısı (Köksal, 2007).

Tokoferoller, flavonoidler, alkali gallatlar, BHA, BHT ve TBHQ antioksidanların en önemlileridir (Keskin ve Erkmen, 1987). Bunlar oksidasyon hızını azaltabilen bileşiklerdir. Etki mekanizmaları metal iyonlarını şelatlamak, oksijen molekülünü tutmak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, UV ışınlarını absorblamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmek şeklindedir. Bu antioksidanlar ‘antioksidan sinerjistler’dir. Tek başlarına buldukları ortamlarda antioksidan etkileri çok düşüktür veya hiç göstermezler. Ancak ortamda başka antioksidan madde bulunursa yalnız olarak gösterdikleri etkiden daha çok etkili olurlar. Bu şekilde antioksidan etkisini arttıran maddelere *sinerjist* denir. Askorbik asid, birçok aminoasit, polifosfatlar ve tartarik asit gibi maddeler fenollü antioksidanların etkilerini arttırırlar (Keskin ve Erkmen, 1987). Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjist etkiden dolayı birlikte antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ancak tokoferol ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi nispeten sentetik antioksidanlardan daha düşüktür (Nishina, 1991).

Antioksidanlar yükseltgenen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle, hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Bir antioksidanın aktivitesi radikal süpürme yeteneği, hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş

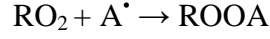
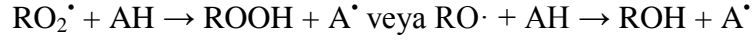
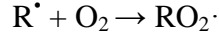
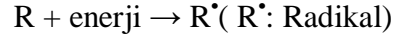


olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan), metal şelatlama potansiyeli, diğer antioksidanlarla olan etkileşime bağlıdır (Miller and Paganga, 1997).



**Şekil 1.9.**  $\alpha$ -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi (Gülçin, 2002).

Antioksidan maddelerin işleyiş mekanizmaları radikalik zincir reaksiyon mekanizmasına göre enerji emilimi ile aktive edilen madde, oksijenle birleşerek okside olmakta ve bu şekilde meydana gelen aktiflenmiş peroksit molekülleri, enerjilerini maddenin okside olabilen başka moleküllerine aktararak otoksidasyona devam etmektedir. Antioksidanların kullanımı ile aktivasyon enerjisini antioksidan molekülü kullanmakta, bu enerjiyi başka moleküllere aktaramamaktadır. Antioksidan molekülünün araya girmesiyle otoksidasyona uğrayan maddenin birçok molekülü oksidasyondan kurtulmaktadır. Aşağıda antioksidan maddenin çalışma mekanizması görülmektedir.



Aktif antioksidanın molekülü ( $A^{\cdot}$ ) enerjisini radikal moleküllerine aktarmamakta, genellikle inaktif moleküllere okside olmaktadır

(AH: Antioksidan molekül,  $A^{\cdot}$  : Aktif antioksidan molekülü, AO: İnaktif antioksidan molekülü).

Antioksidan maddelerin bu önemli görevlerinden yola çıkarak Erzincan yöresine has bir meyve çeşidi olan Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktiviteleri araştırıldı.

Elma, Rosaceae familyasının Pomoideae alt familyasının *Malus* cinsinin, ılıman iklim meyveleri içersinde üretimi en fazla yapılan meyve türüdür. Elma ağaçları kış dinlenme döneminde yapraklarını dökerler. Ağaç ve ağaççık şeklinde büyüyen elma çok yıllık odunsu bir bitkidir. Kuzey ve Güney yarım kürenin ılıman iklim kuşağına sahip bölgelerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Çok eski çağlardan beri üretilen elma, aşılama ve ıslah yöntemiyle pek çok çeşide bürünerek çoğalabilmiştir. De Condolle 1983 'te yayınladığı 'L' Origine Des Plantes Culvutes' adlı eserinde Dioscordies ve Theopratus gibi eski tarihçilere dayanarak elmanın dört bin yıldan daha fazla tarihinin olduğunu bildirmektedir.

Roma döneminden bugüne dünyada 2200 elma çeşidinin yetiştiriciliğinin gerçekleştirildiği bilinmektedir. Ancak bugün birinci derecede ekonomik öneme sahip çeşit sayısı 20 kadardır (Gündüz, 1997). Birçok yazar ve araştırmacı elmanın gen merkezleri arasında Anadolu'yu göstermektedir (Ülkümen, 1937; 1973; Brown, 1975; Özbek, 1978).

Elmanın anavatanı Anadolu'yu da içine alan Güney Kafkaslardır. Ekolojik şartların uygunluğu ve gen merkezi olması nedeniyle elma, yurdumuzun hemen her yerinde çok eski yıllardan beri yetiştirilmektedir. Fakat en uygun kültür merkezleri yabansininin yayılma alanlarına paralel olarak Kuzey Anadolu'da bulunmaktadır. Kuzey Anadolu, Karadeniz kıyı bölgesi ile İç Anadolu ve Doğu Anadolu yayları arasındaki geçit bölgeleri ve son yıllarda güneyde göller bölgesi elmanın önemli yetiştiricilik alanlarını oluşturmaktadır (Öztürkci, 2007).

Meşhur seyyahımız Evliya Çelebi Seyahatnamesinde Erzincan ve çevresinde armut, kayısı ve vişne gibi meyve türlerinin yanında elma yetiştiriciliğinin de yaygın olduğunu kaydetmiştir. Yörede Starking Delicious, Golden Delicious, Granny Smith, gibi bilinen standart çeşitlerin dışında; gelin elması, kırmızı orak elması, yaz misketi, sarı orak elması, gibi yazlık, kabak elması, tavşanbaşı elması gibi güzlük, karasakkı ve aksakkı elmaları gibi kışlık olmak üzere birçok mahalli elma çeşitleri de yetiştirilmektedir (Öztürkci, 2007).

Erzincan yöresinde isimleri yukarıda ifade edilen genotiplerin popülasyon da klonları bulunmaktadır. Bu klonlar arasında yörede uzun yıllardır yapılan yetiştiriciliğin beraberinde getirebileceği fenotipik ve genotipik varyasyonun olması muhtemeldir. Yani her bir çeşidin ıslah nitelikleri bakımından birbirinden farklı özellikler sergileyen genotipleri mevcut olabilir. Genotipler arasında verimlilik, peryodisiteye eğilim, meyve renklenmesi, meyve tadı ve aroması, meyve iriliği, ağaç gelişimi gibi daha birçok özellikler yönünden farklılıklar olabilir (Öztürkci, 2007). Buradan çalışmamızda incelediğimiz antioksidan özelliğinde genotipler arasında farklılık gösterebileceğini ve üstün nitelikli genotiplerin önemli antioksidan özellik gösterebileceğini çıkarabiliriz.

Bu husus şimdiye kadar araştırılmamıştır. Yörede daha önceden yapılmış ilk araştırmalarda lokal çeşitler arasında üzerinde durulması gereken önemli genotiplerin varlığına işaret edilmiş ve bu genotiplerin gerçek niteliklerinin daha detaylı çalışmalarla ortaya çıkarılması gerekliliği vurgulanmıştır. Hatta bu genotipler arasında standart elma çeşitleriyle yarışabilecek nitelikte elma genotiplerinin varlığı da bildirilmiştir (Öztürkci, 2007). Bu çeşitlerden en dikkat çekici olanlarından birisi Sakkı elmasıdır. Yörede bu çeşidin çok sayıda klonu bulunmaktadır.



**Şekil 1.10.** Sakkı Elması (*Malus communis* L.)

## 2.KAYNAK ÖZETLERİ

Elmanın, güçlü antioksidan özellikte olduğu, karaciğer ve kolon kanser hücrelerini büyük ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Boyer and Liu, 2004). Süleyman Demirel Üniversitesinde yürütülen bir çalışmada elma sirkesinin sağlık bakımından önemli fonksiyonel özellikleri tespit edilmiştir. Yapılan hayvan denemesinde elma sirkesi tüketimi HDL-kolesterol değerini yükseltmiş, kilo alımını azaltmıştır (Budak vd., 2011).

Elma, flavonoidlerin önemli kaynaklarından biridir. Elma ve elma ürünlerindeki renk, tat ve koku gibi duyuşal özellikler içeriğindeki fenolik bileşenlerden etkilenmektedir (Lea and Arnold, 1978; Eberhardt *et al.*, 2000). Elma, flavonoid (kuersetin, sirinjik), flavonol (epikateşin, kateşin), proksiyanidin ve antosiyaninler içermektedir. Elmada fenolik asit türevlerinden klorojenik asit bulunmaktadır (Shoji *et al.*, 2004). Elma suyu ve şarabı kuersetin, sirinjik, epikateşin, klorojenik asit, proksiyanidin, mirisetin, piloridzin bakımından zengindir (Peng *et al.*, 2005). Akdeniz ülkelerindeki insanların geleneksel beslenmelerinde meyve ve sebze tüketimi yüksek düzeydedir. Düzenli meyve ve sebze tüketen kişilerde kardiovasküler hastalıklar ve bazı kanser tiplerinin engellendiğı belirtilmektedir. “Günde bir elma doktoru evden uzak tutar” sözü ile bu önem vurgulanmıştır (Williamson and Manach, 2005).

Elmanın beslenme açısından önemi içerdiği tuzlar ve vitaminlerden kaynaklanmaktadır. Elmada bulunan karbonhidratların önemli bir kısmını şekerler teşkil eder ve taze bir elmada fruktoz, sakaroz ve gilikoş bulunur. Elma meyvesinde A ve C vitaminleri oldukça fazladır. Elmanın sağlık açısından da önemi çoktur. Kandaki asit-baz dengesi üzerine olumlu etkisinin yanında insan sağlığı açısından önemi bulunduğu belirlenmiştir (Öztürkci, 2007).

Meyvelerin antioksidan aktivitesi başlıca fenolik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Elma fenolik bileşikler bakımından zengin bir besindir. Meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşen miktarı ile antioksidan aktivitenin doğrudan ilişkili olduğu ve elmalarda C vitamininin toplam antioksidan aktiviteye daha az katkı sağladığı bildirilmektedir (Sun *et al.*, 2002). Antioksidan özelliklerinin yanı sıra fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin renk, tat ve koku özelliklerini de etkilemektedir (Cemeroğlu vd., 2001; Belitz *et al.*, 2004).

Elmadaki başlıca antioksidan özellik gösteren bileşenlerden fenolik maddelerin beyin hücrelerini koruyucu, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, kalbi koruyucu ve HDL kolesterolü yükseltici etkisinin olduğu bildirilmektedir. Antioksidan maddeler, serbest radikal oluşumunu engelleyerek oluşan serbest radikallerin aktivitesini durdurarak ya da azaltarak etki göstermektedir (Singh and Singh, 2008). Diyetle antioksidanları yüksek miktarda içeren gıdaların tüketimi oksidasyonun neden olabileceği hasarları azaltmaktadır.

Elmanın taze tüketiminin yanında işlenerek kuru ürün, reçel, marmelat, jöle, meyve suyu, sirke, şarap ve brendi olarak tüketimi mevcuttur (Belitz *et al.*, 2004). Elma ve ürünleri potasyum, fosfor, kalsiyum, A vitamini ve askorbik asitçe zengin kaynaklardır. Glukoz, fruktoz ve sakkaroz elmada en fazla bulunan şekerlerdir (Oke and Paliyath, 2006).

Sentetik antioksidan maddelerin sağlık açısından bazı sakıncalar doğurabileceğinin ortaya çıkması ve enzimsel antioksidan savunmanın yetersiz kalması durumları insanları zararsız ve takviye antioksidan arayışına yöneltmiştir. Bu durum antioksidan maddelerin bitkilerden ve hayvansal organizmalardan elde edilip kullanımının gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu amaçla son zamanlarda çeşitli bitkilerin antioksidan kapasitelerini belirlemek için çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Antioksidan kapasitesi araştırılan bitkiler arasında bir çalışmada Labiatae familyasına ait olan ve Türkiye’de yayılış gösteren *Ballota* cinsine ait 16 bitki türünün etanol özütünün lipid peroksidasyonu ve süperoksit anyon oluşumu üzerinde antioksidan özellikleri incelenmiştir (Citoğlu vd., 2004), yapılan araştırmalar özellikle yeşil çayın yüksek oranlarda içerdiği kateşinlerin (kuru ağırlığın %20-30’u) (Wang *et al.*, 2000), yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, böylece antikanserojenik, antimutajenik ve tümör oluşumunu inhibe edici özellikler kazandığını ortaya koymuştur, benzer şekilde mürver ağacı meyvesi ve çiçeği üzerine yapılan araştırmalarda mürver ağacının da serbest radikalleri nötralize ve oksidasyon reaksiyonlarını inhibe etmede etkili olduğu ortaya konmuştur (Dawidowicz *et al.*, 2006) ve diğer bir çalışmada meyvesi sevilerek tüketilen böğürtlenin yüksek oranda antioksidan madde ihtiva ettiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda bu meyvenin konsantresinde flavonoller, hidroksisinamik asit türevleri, stilbenoidler, flavon-3-oller, elagik asit türevleri gibi flavonoidler ve diğer fenolik asitler belirlenmiştir (Burdurlu vd., 2005), vb. çalışmalar bulunmaktadır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamız Erzincan İlinde yetiştirilmekte olan ve Erzincan İli Üzümlü İlçesinden temin edilen Sakkı Elması (*Malus communis* L.) üzerinde yoğunlaştırıldı. Bu elmanın meyve (kabuk ve etli kısım) ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktivitesi iyon indirgeme kapasitesi, toplam antioksidan aktivite kapasitesi, DPPH<sup>\*</sup> serbest radikali giderme kapasitesi, toplam fenolik ve flavonoit miktarı tayini gibi çeşitli yöntemlerle tespit edildi ve referanslarla mukayesesi yapıldı.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali, linoleik asit,  $\alpha$ -tokoferol, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween-20) ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Amonyum tiyosiyanat Merck'ten satın alındı.

##### 3.1.2. Yararlanılan malzeme, alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucu	: Sanyo, Japan
pH-metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Scaltec SBA 41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Evaporatör	: Heidolph 94200, Bioblock Scientific
Saf su cihazı	: Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	: 3 cm <sup>3</sup> 'lük Kuartz Küvet

### **3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması**

#### **3.1.3.a. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler**

1. % 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi: 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 mL'lik balon jode bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. Folin-Ciocalteu Reaktifi: Satın alındığı şekilde kullanılmıştır.

#### **3.1.3.b. Toplam flavonoit miktarı tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 1 M'lık  $\text{CH}_3\text{COONa}$  çözeltisi: 8,2 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. %10'luk  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  çözeltisi: 10 mL  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  alınıp hacmi destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

#### **3.1.3.c. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,04 M pH: 7,4 fosfat tamponu hazırlanması: 1,135 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  alındı 180 mL destile suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı. Destile su ile toplam hacmi 200 mL'ye tamamlandı.
2. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 0,017 M'lık linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265  $\mu\text{L}$  linoleik asit 50 mL ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.

3. %3,5'luk HCl çözeltisinin hazırlanması: %37'lik HCl'den 9,46 mL alınarak 100 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. 20 mM FeCl<sub>2</sub> çözeltisi hazırlanması: 281 mg FeCl<sub>2</sub>.3/4H<sub>2</sub>O, %3,5'luk HCl ile çözülerek hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamamlandı.
5. %30'luk NH<sub>4</sub>SCN çözeltisinin hazırlanması: 15 g NH<sub>4</sub>SCN saf suda çözüldü, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

#### **3.1.3.d. Ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) ferröz iyonlarına (Fe<sup>2+</sup>) indirgeme kuvveti tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> yaklaşık 180 mL destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. %1'lik K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 150 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. %0,1'lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisinin hazırlanması: 165 mg FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

#### **3.1.3.e. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,01 M'lık CuCl<sub>2</sub> çözeltisinin hazırlanması: 47 mg CuCl<sub>2</sub> alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.

2.  $7,5 \times 10^{-3}$  M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 mL etanolde çözüldü.

3. 1 M'lık  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 7,7 g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  alındı ve 80 mL saf suda çözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

### 3.1.3.f. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

1.  $10^{-3}$  M'lık DPPH' çözeltisinin hazırlanması: 39 mg DPPH' etanolde tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca etanolde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının toplanması ve kurutulması**

Deneşlerde kullanılan Sakkı Elması Erzincan İli Üzümlü ilçesinden temin edildi. Toplanan numuneler daha sonra küçük parçalara ayrıldı ve oda sıcaklığında gölgede kurutuldu. Kurutulan nümuneler meyve ve çekirdek kısımları olarak ayrıldı ve antioksidan ile ilgili çalışmalarda kullanılıncaya kadar da karanlıkta ve buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.2.2. Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının hazırlanması**

Etanol ekstresinin hazırlanması literatürde belirtildiği gibi yapıldı (Gülçin, 2005). Etanol ekstresi için blenderde öğütölmüş ve toz haline getirilmiş. Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımları 20 g numuneler 1 litrelik ağzı kapalı erlenlerde numunelerin yirmi katı etanol ile (400 mL) manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen etanol ekstraları süzgeç kâğıdından süzöldü. Süzölmüş ekstralar birleştirilerek evaporatörde 40 °C’de etanol uzaklaştırıldı.

### **3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini**

Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı FCR ile belirlendi (Singleton *et al.*, 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Bunun için önce bir standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg gallik asit 25 mL destile suda çözüldü ve 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözeltili hazırlandı. Bu stok çözeltiden 100-600 µg gallik asit içeren çözeltiler erlenlere aktarıldı ve hacim destile suyla 23 mL’ye tamamlandı. Erlenlere sırasıyla 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da %2’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 1,5 mL ilave edildi.

Karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansı 760 nm'de destile sudan oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol için numune yerine destile su kullanıldı.

Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Gülçin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre değerlendirildi. Daha önce hazırlanan her bir stok çözeltiliden 1 mg alındı ve vezin kaplarına aktarıldı ve hacim 23 mL'ye destile suyla tamamlandı. Karışıma 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da 1,5 mL %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edildi. Numuneler iki saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda numunelerin absorbansı saf sudan oluşan köre karşı 760 nm'de okundu. Bu işlemler üçer defa tekrarlandı. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalent miktarı standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla bulundu. Bulgular gallik asit ekivalent (GAE) ve mikrogram olarak verildi (r<sup>2</sup>:0,9681).

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 760\text{nm})} = 0,002 \times [\text{Gallik asit}] + 0,0025$$

#### 3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini

Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoit bileşik miktarı Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre belirlendi (Park *et al.*, 1997). Standart flavonoit bileşik olarak kuarsetin kullanıldı. Bunun için önce standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg kuarsetin 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltili hazırlandı. Bu stok çözeltiliden 10-50 µg kuarsetin içeren çözeltili deney tüplerine aktarıldı. Daha sonra bunun üzerine sırasıyla 0,1 mL (1M) suda hazırlanmış CH<sub>3</sub>COOK ve 0,1 mL (%10) Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> çözeltilerini içeren 4,3 mL etanol çözeltilisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorbanları etanolden oluşan köre karşı kaydedildi. Toplam flavonoit konsantrasyonu kuarsetinin standart olarak kullanıldığı aşağıda verilen

standart grafik denkleminde mikrogram kuarsetin ekivalent (QE) olarak hesaplandı ( $r^2$ : 0,9836).

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 415\text{nm})} = 0,0147 \times [\text{Kuersetin}]$$

Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoit bileşik miktarını belirlemek için toplam fenolik bileşik miktarı tayininde kullanılan stok çözeltilerden deney tüplerine sırasıyla 1000 µg ekstre ihtiva eden stok çözelti aktarıldı. Daha sonra ise deney tüplerine aktarılan farklı miktarlardaki ekstralar 0,1 mL (1M) suda hazırlanmış potasyum asetat ve 0,1 mL (%10) alüminyum nitrat çözeltilerini içeren 4,3 mL etanol çözeltisi ile seyreltildi ve vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm’de absorbansları aynı şekilde kaydedildi.

### 3.2.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Mitsuda *et al.*, 1966). Öncelikle stok çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla 20 mg etanol ekstraları 20 mL etanolde çözünerek hazırlandı. İstenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözeltilerden vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL’ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2,5 mL tampon çözelti ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37 °C’de gerçekleştirildi. Her altı saatte bir vezin kaplarından 100’er µL alındı 4,7 mL etanol bulunan deney tüplerine konuldu 100 µL Fe<sup>2+</sup> çözeltisi daha sonra da 100 µL SCN<sup>-</sup> çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 4,8 mL etanol bulunan deney tüpüne 100 µL Fe<sup>2+</sup> ve 100 µL SCN<sup>-</sup> çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin 500 nm’deki absorbansları köre karşı okundu.

### 3.2.6. Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti tayini

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Oyaizu, 1986). Taze hazırlanan stok çözeltilerden 10, 20 ve 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olacak şekilde alındı ve deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [ $K_3Fe(CN)_6$ ] ilave edildikten sonra karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi.

Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerinede 2,5 mL destile su ve %0,1'lik 0,5 mL  $FeCl_3$  ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

### 3.2.7. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının kuprik iyonu ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının (2006) kullandığı Kuprak metodunun hafif bir modifikasyonuna göre yapıldı. Bunun için deney tüplerine 0,01 M'lık 0,25 mL  $CuCl_2$  çözeltisi ilave edildi.

Bunun üzerine 0,25 mL  $7,5 \times 10^{-3}$  M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL 1M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10–30  $\mu\text{g/mL}$ ) Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstraları ve standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesini göstermektedir.



### 3.2.8. DPPH• Serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini

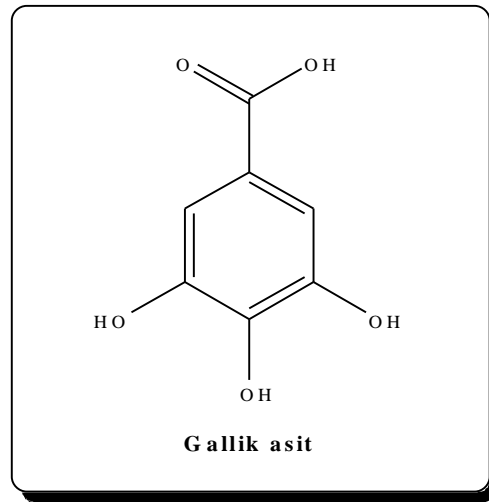
DPPH• serbest radikal giderme Blois metoduna göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH•'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 mL olacak şekilde destile etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 mL ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedildi. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH• çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

#### 4.1.1. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları

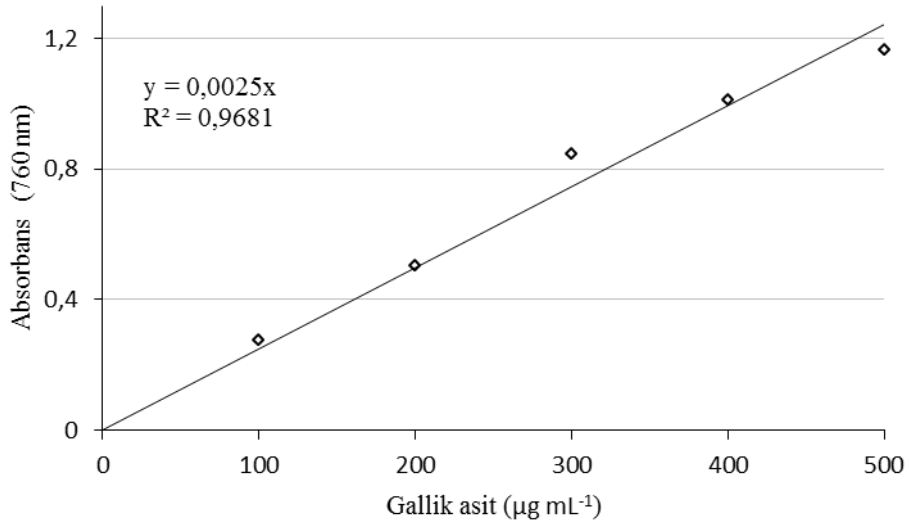
Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarını tespit için standart fenolik bileşik olarak kullanılan galik asitin açık yapısı Şekil 4.1.' de görülmektedir.



**Şekil 4.1.** Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan gallik asitin açık yapısı (Köksal, 2007).

Bunun için öncelikle gallik asitten standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formülden de yine her iki ekstrede bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı ( $r^2$ : 0,9681). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir.

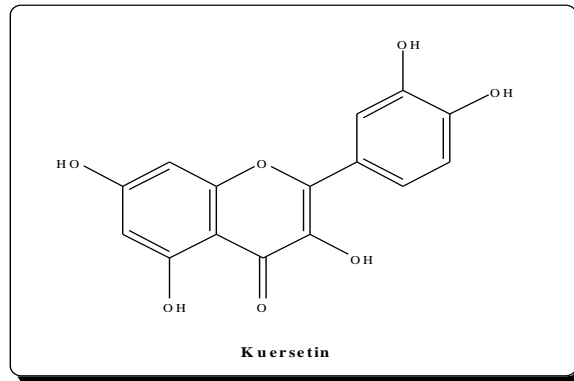
$$\text{Absorbans}_{(\lambda 760\text{nm})} = 0,0025 \times [\text{Gallik asit}]$$



**Şekil 4.2.** Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için gallik asit ile hazırlanan standart grafik

#### 4.1.2. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulgular

Şekil 4.3.' te açık yapısı verilen ve birçok çalışmada standart antioksidan olarak kullanılan kuersetin (Büyükokuroğlu vd., 2001; Gülçin, 2002; Gülçin vd., 2004) çalışmamızda standart flavonoid olarak kullanıldı (Türkoğlu vd., 2006). Flavonoidler iki fenil halaksının propan zinciri ile birleşmesinden meydana gelen difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir.



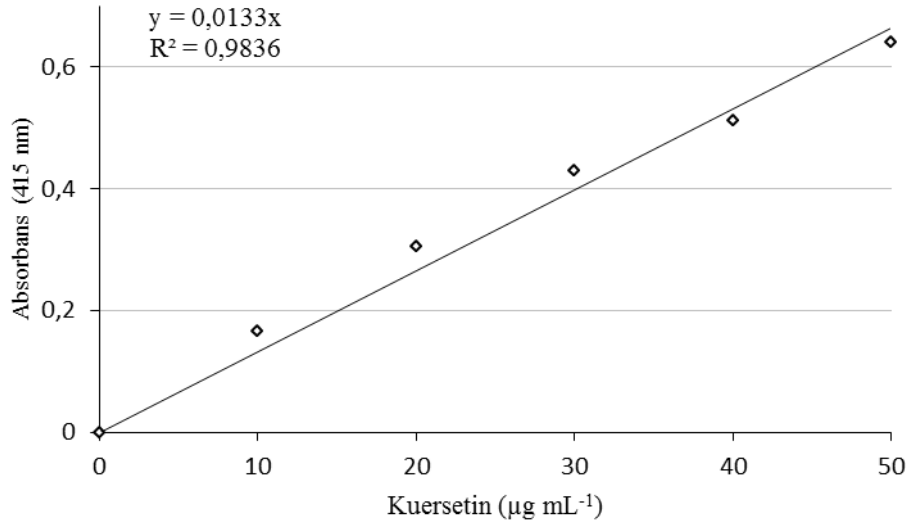
**Şekil 4.3.** Standart ve iyi bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı (Köksal, 2007).

Flavonoidler insanlar tarafından sentezlenemeyen bitki fitokimyasallarıdır. Flavonoidler, özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerin (renk maddelerinin) C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> çatısına sahip olanlarına verilen addır. Bu yapıdaki karbon halkaları A-C-B sırasındaki harflerle simgelenir. Flavonoidlerin tümü C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yapısındadır, ancak moleküldeki hidroksil (OH) grubu sayısı ve dağılımı açısından farklıdırlar. Flavonoidler ve fenolik yapıları antioksidan bileşenler değişken hidroksil (-OH) grubu sayesinde lipid radikallerine bir hidrojen atomu verebilirler ve lipid oksidasyonunu engellerler. Bileşiğin yapısı ile antioksidan aktivitesi arasında ilişki vardır. Fenolik bileşiklerde -OH grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 3-OH, 4-OH, 5-OH gruplarının olması antioksidan aktivitesi üzerinde etkilidir (Cotelle *et al.*, 1996; Çimen, 1999).

Genel olarak 'Flavonoidler' ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, enzim aktivitelerini düzenleme, hücre çoğalmasını inhibe etme, demir ve bakır şelasyonu,  $\alpha$ - tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, antibiyotik, immünstimulan, antiallerjik, antidiyareik, antiülser, östrojenik, antiviral ve daha birçok etkilerinin olduğu söylenebilir (Dillard and German, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Sakkı Elmasından elde edilen su ve etanol ekstratlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarı için öncelikle kuersetin standart olarak kullanılarak bir standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla her iki ekstratda bulunan toplam flavonoid miktarı kuersetin ekivalent (QE) olarak hesaplandı ( $r^2$ : 0,9836). Bu amaçla hazırlanan standart galik asit grafiği Şekil 4.4.'te verilmiştir.

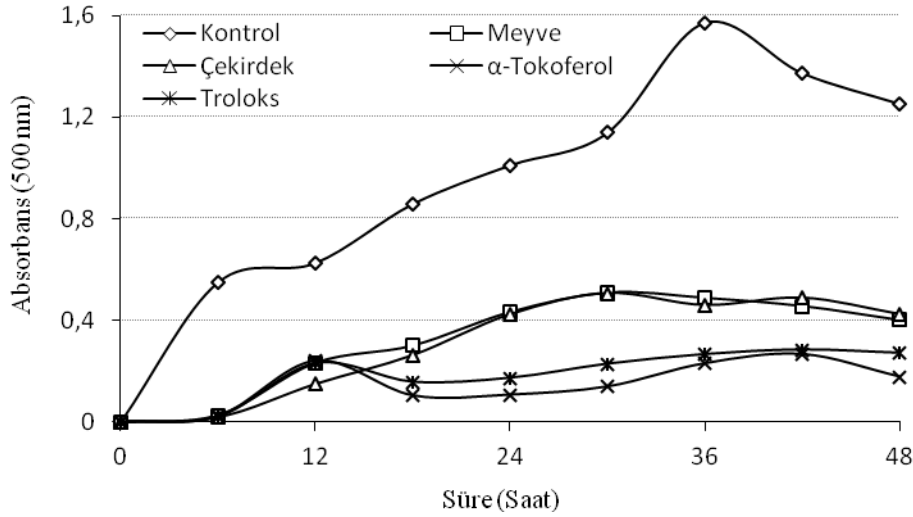
$$\text{Absorbans}_{(\lambda 415\text{nm})} = 0,0133 \times [\text{Kuersetin}]$$



**Şekil 4.4.** 10-50  $\mu\text{g}$  arasında kuersetin kullanılarak toplam flavonoit miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği

#### 4.1.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite bulguları

Çalışmada kullanılan Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstrelerinden antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Toplam antioksidan aktivite tayini için  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonları kullanıldı. Şekil 4.5.'te görüldüğü gibi Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstrelerinin birbirine yakın fakat standart antioksidan olarak kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve trolokstan daha az total antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca elmanın çekirdek kısmının meyve kısmına göre daha fazla total antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

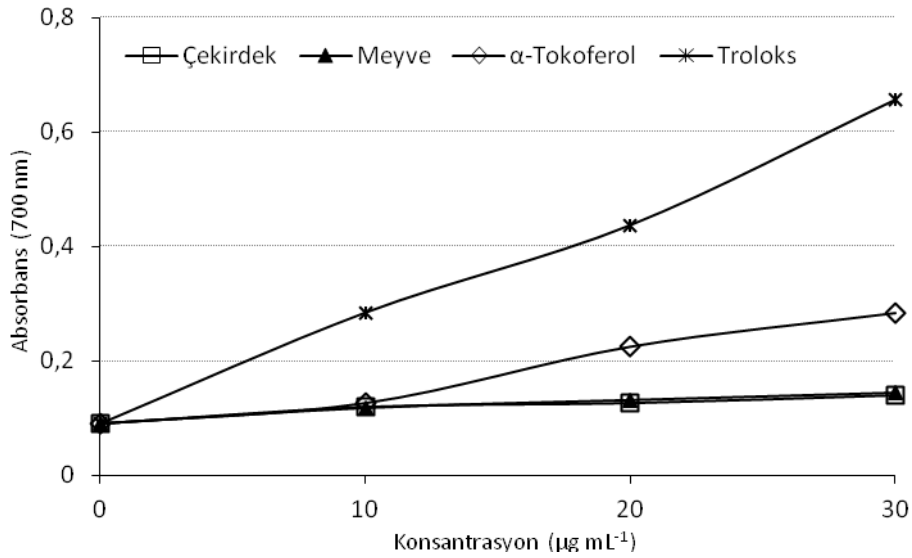


**Şekil 4.5.** Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstratlarının  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  deki konsantrasyonda toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

#### 4.1.4. Ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme kuvveti ile ilgili bulgular

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin, 2006b; Gülçin vd., 2006c). Çalışmada kullanılan Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstratlarında indirgeme kapasitesi artan konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı görülürken, meyve ve çekirdeğin demir indirgeme aktivitesinin aynı olduğu belirlenmiştir.

Her iki ekstrenin indirgeme potansiyeli, farklı konsantrasyonlardaki ( $10\text{--}30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) çözeltilerinin  $700 \text{ nm}$ 'deki absorbanları ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 4.6.'dan görülebileceği gibi meyve ve çekirdeğin kullanılan troloks ve  $\alpha$ -tokoferol gibi standartlardan daha az indirgeme potansiyeli gösterdiği tespit edilmiştir.

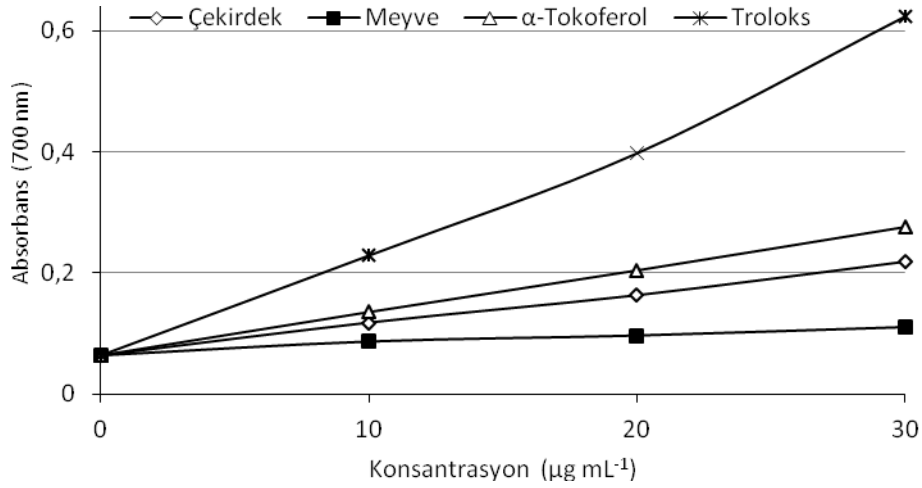


**Şekil 4.6.** Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki ( $10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

#### 4.1.5. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti bulguları

Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi ekstraların artan konsantrasyonu ile artmıştır. Meyve ve çekirdek kısımlarının indirgeme gücü standart antioksidan bileşiklerden az olmakla beraber çekirdek kısmının indirgeme gücünün  $\alpha$ -tokoferol'e yakın olduğu ve dolayısıyla antioksidan özelliğinin meyve kısmına göre yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Her iki ekstrenin kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki ( $10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) çözeltilerinin  $450 \text{ nm}$ 'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.7).



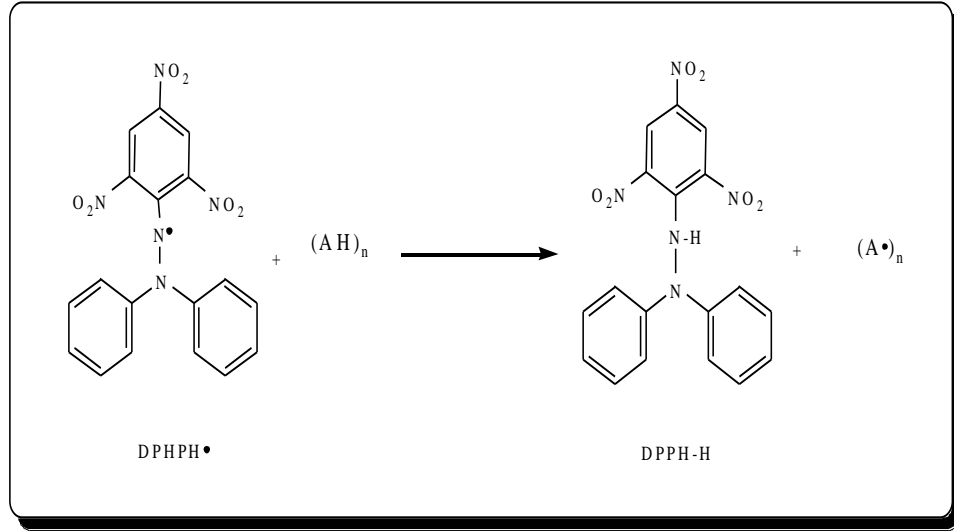
**Şekil 4.7.** Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg mL<sup>-1</sup>) kuprik iyonlarını (Cu<sup>2+</sup>) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

#### 4.1.6. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

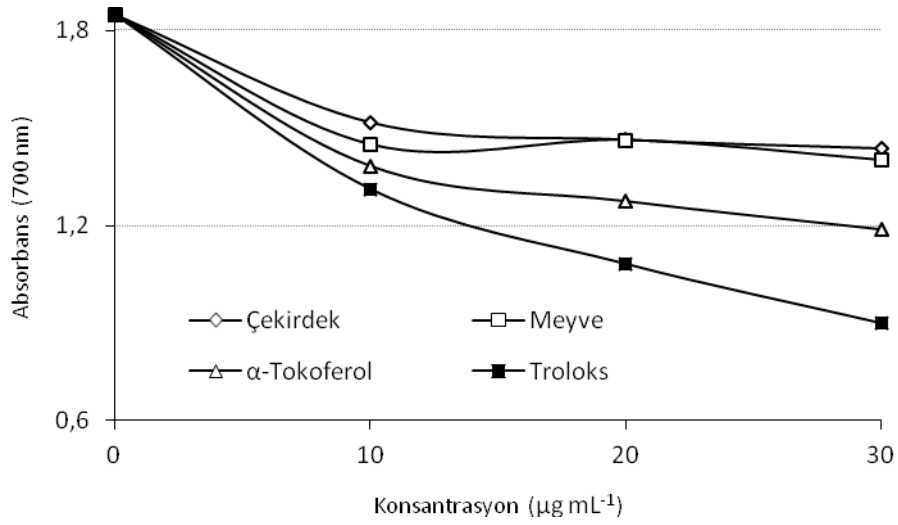
Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının, DPPH' serbest radikalini giderme aktivitesini tespiti için yapılan çalışmada α-tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşikleri kullanılmıştır.

Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımları, DPPH' serbest radikalini giderilmesinde (Şekil 4.8) farklı etki göstermişlerdir. DPPH' serbest radikalini giderme meyve ve çekirdek kısımlarında hemen hemen aynı olmakla birlikte meyvede biraz daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca meyve ve çekirdeğin DPPH' serbest radikalini standartlardan az olmakla birlikte α-tokoferol'e yakın miktarda giderdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).





Şekil 4.8. Bir antioksidan tarafından DPPH• radikalinin giderilmesi (Gülçin, 2002).



Şekil 4.9. Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/mL) DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

## 4.2. Tartışma

Bitkisel kaynaklı antioksidan maddeler etkileri yönünden çok yönlü olarak araştırılmaktadır ve uygun bir diyet ile düzenli olarak alınmaları vasıtasıyla eksiklikleri büyük oranda düzeltmektedirler. Bitkisel antioksidanların alımını artırarak dışarıdan müdahalenin serbest radikallerin tehlikesini azaltabileceği düşünülmektedir (Ng *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2007). Bitkiler insan sağlığının sürdürülmesinde ve insan yaşamının kalitesinin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dünyada yaşayan insanların <%80 kadarının primer sağlık ihtiyaçları için geleneksel ilaçları kullandıklarını ve bu tedavilerin çoğunun bitki ekstraktlarını ve etkin maddelerini kullanarak ortaya çıktığını tahmin etmektedir (Winston, 1999).

Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstraktlarının antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite,  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) küpröz iyonlarına ( $Cu^+$ ) indirgeme kapasitesi, DPPH<sup>\*</sup> serbest radikal giderme aktivitesi, farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi. Kullanılan antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan aktiviteler kozmetik ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks ile mukayese edildi.

En önemli bitki kaynaklı doğal antioksidanlar arasında fenolik bileşikler, askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen sayılabilir. Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Kronik hastalıkların, DNA hasarlarının, mutasyonların, karsinogenezin azaltılması, patojenik bakteriyel gelişiminin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir (Zhu *et al.*, 2002).

Fenolik bileşikler özellikle flavonoidler hidroksil guruplarında bulunan hidrojenlerini kolaylıkla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalinin rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir.

Kimyasal olarak flavonoidlerin güçlü antioksidan özellikleri üç özelliğten kaynaklanır; aromatik halka yapılarındaki hidroksil gurupları sayesinde hidrojen vererek redoks reaksiyonlarına girebilirler. Bu sayede serbest radikalleri yok edebilirler. Aromatik heterosiklik ve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla dayanıklı bir kimyasal yapı oluştururlar. Metal şelatlama kapasitesine sahip yapısal gurupları vasıtasıyla  $\text{OH}^{\cdot-}$  ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$  gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler. Flavonoitler antioksidan özelliğe sahip olup, kronik kalp hastalıkları gibi birçok hastalığı önleyen önemli bir doğal bileşik gurubudur (Cam ve Hışıl, 2003).

Son yıllarda “oksidatif stres” ve oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri üzerine yapılan çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir (Tripathi *et al.*, 2007). Organizmaların ekzojen ve endojen faktörlere maruziyetleri sonucunda birçok reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluştuğu ve bu reaktif oksijen türlerinin homeostatik dengeyi bozduğu açıkça ortaya konulmuştur (Halliwell and Gutteridge, 1999; Bonnefont *et al.*, 2000). Hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre hidrojen koparmasıyla oluşan radikal çift bağın konjugasyonu ile kararlı hale getirmesi ve böylece de hidrojenin daha kolay koparılmasına sebep olmasından dolayı, böyle ROS'lere duyarlı kritik bileşenlerdir. ROS'ler, hücre içindeki yapısal değişimleri ve fonksiyonel düzeni bozarlar ve bu da hastalıklara yol açan bir takım ciddi anomaliler ile birlikte direkt olarak sitotoksositeye ve/veya indirekt olarak genotoksositeye neden olmaktadır (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Serbest oksijen radikalleri, hücresel membranlara lipit peroksidasyonu yoluyla zarar verir. Peroksidasyon reaksiyonları yağ asitlerinin açıl zincirindeki çift bağlarla serbest oksijen radikalleri arasında gerçekleşir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının uzaklaştırılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ( $L^{\bullet}$ ) ve lipid peroksit radikallerinin ( $LOO^{\bullet}$ ) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" denir. Lipid radikali ( $L^{\bullet}$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ( $L^{\bullet}$ ) moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ( $LOO^{\bullet}$ ) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ( $LOO^{\bullet}$ ), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Feibo, 2002; Cicerali, 2004). Lipitlerin oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin ( $LOOH$ ) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirirken serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artabilir. Lokal olarak hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir (Feibo, 2002; Cicerali, 2004).

*In vivo* olarak serbest demir ve bakırın varlığı kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları ( $Fe^{3+}$ ) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ) şeklinde ferritin ve hemosiferin proteinlerinde depolanır. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer "demir havuzu" olan ferritin ve hemosiferinde depolanırlar.

İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmayan bir formda olup, seruplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994).

Bu durumda radikallerle antioksidan savunma sistemleri arasında denge söz konusudur. Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde bu denge bozulmaktadır. Örneğin doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya lizis olmuş hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Bu durum hücre ve dolayısıyla doku hasarını daha da hızlandırır. Parkinson hastalığı, substantia nigra'da mevcut hücrelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır. Böylece Parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır. Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigranın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunun yanısıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol gruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Haugaard, 1968; Pacific, 1991).

Antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda bu sorunun dış kaynaklı (özellikle doğal) antioksidanlarca ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır. Örneğin doğal antioksidan olan askorbik asidin özellikle bu durumda kullanılan özel bir antioksidan olduğu bilinmektedir. Askorbik asit bitkiler ve birçok memeli tarafından karaciğerde glukozdan sentezlenir. Askorbik asit bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Askorbik asitin en önemli özelliği indirgeyici bir molekül olmasıdır. Askorbik asit  $Fe^{3+}$ 'ü  $Fe^{2+}$ 'ye indirgeyebilir. *In vivo* olarak indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin söndürülmesinde de önemli rolü vardır.

Demir ve bakır iyonlarının, hidroksilasyonu gerçekleştirebilmeleri için hidroksilaz enzimlerinin aktif merkezlerinde indirgenmiş halde bulunmaları gerekir. Bu özellik, bir kofaktör olan askorbik asit tarafından sağlanır. Bir molekülün indirgeme

kapasitesi onun antioksidan potansiyelinin bir göstergesidir. Oksidasyona uğrayan moleküller, indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı askorbik asit tarafından indirgenebilirler. Bu sebeple askorbik asit antioksidan kapasite sergilemektedir (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan antioksidan parameterlerden biridir. Ferrik tiyosiyonat metodu, lipid peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksitin miktarını ölçer. Bu analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asitin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Bu metodun esası, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitin spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise  $Fe^{2+}$ 'yi  $Fe^{3+}$ 'e yükseltir. Daha sonra  $Fe^{3+}$ , ilave edilen tiyosiyanat ile kompleks oluşturularak 500 nm'de maksimum absorbans verir.

Sakkı Elmasının meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstratlarının toplam antioksidan aktivitesinde olduğu gibi indirgeme kapasitesinde de artan konsantrasyona bağlı olarak standartlara yakın olmakla birlikte çekirdeğin meyveye göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. İlk bakışta oksidasyonun indirgeme gücü yüksek olan ekstratlerce daha kuvvetli bir şekilde bastırılacağı düşünülebilir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir faktördür (Meir *et al.*, 1995). Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden gidebilir. Örneğin, oksidasyonun geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir.

Son zamanlarda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoit, flavonoit ve fenolik bileşik

içeriği bakımından zengin olmaları ve bu bileşiklerin herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır (Kulkarni *et al.*, 2006).

Sıklıkla kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin bulunmasından sonra araştırmalar tamamen bitkisel orijinli antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin vd., 2006a). Antioksidan aktivite tayin metotları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesinin araştırılması, DPPH\* radikal gidermesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin, 2005; 2006b).

Mevcut çalışmada da bu metotlar kullanıldı ve bulgular birer doğal ve standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan metotların hepsinde elmanın meyve ve çekirdek kısımlarının kullanılan farklı yöntemlerde birbirine göre farklı aktivite gösterdikleri ve bazı yöntemlerde standart antioksidan olarak kullanılan bileşiklere yakın aktivite gösterirken bazı yöntemlerde daha az aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarında etanol ekstrahelerinin birbirine yakın fakat standart antioksidan olarak kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve trolokstan daha az total antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çekirdeğin meyveye göre biraz daha fazla total antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca elmanın yapısında bulunan fenolik ve flavonoid bileşiklerinin miktarları total olarak tespit edilmiş ve elde edilen sonuçların antioksidan aktivite tayin sonuçları ile önemli bir korelasyon içerisinde olduğu görülmüştür. Çekirdek kısmının meyveye göre daha yüksek fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmamızın bitkilerin antioksidan özelliklerinin incelenmesi araştırmalarına katkı sağlayacak bir çalışma olduğu muhtemeldir.



## 5. SONUÇ

Sonuç olarak Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmamızda iyon indirgeme kapasitesi, toplam antioksidan aktivite kapasitesi, DPPH<sup>\*</sup> serbest radikali giderme kapasitesi, toplam fenolik ve flavonoid miktarı gibi tespitler yapılmıştır.

**Tablo 5.1.** Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının etanol ekstralarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının ekivalent olarak miktarları

	Toplam fenolik bileşik ( $\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ ekstre)	Toplam flavonoid bileşik ( $\mu\text{g QE mg}^{-1}$ ekstre)
Meyve	37.2	4.96
Çekirdek	58.8	4.66

Çalışmamızda yapılan iyon indirgeme kapasitesi, toplam antioksidan aktivite kapasitesi, DPPH<sup>\*</sup> serbest radikali giderme kapasitesi, toplam fenolik ve flavonoid miktarı gibi yöntemlerden elde edilen bulgulardan, Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının farklı antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sakkı Elması (*Malus communis* L.)'nin meyve ve çekirdek kısımlarının birbirine yakın olmakla birlikte çekirdeğin meyveye göre biraz daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği yapılan ölçümler sonucu ortaya konmuştur. Bu sonuca paralel olarak çekirdeğin total fenolik bileşik içeriğinin meyveye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç fenolik yapıların antioksidan özellik göstermesi bakımından anlamlıdır.

## 6. KAYNAKLAR

Ak, Tuba, “Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi”, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Erzurum (2006).

Aksoy, Y., “Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü”, *Klinik Tıp Bilimleri*, 22, 442-448, (2002).

Akkuş, “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, *Mimosa Yayınları*, Konya, (1995).

Altınışik M., “Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar”, Et:20.05.2012, [www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf), (2000).

Anıl, M., “Antioksidan olarak tahıllar-Hububat 2006”, *Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, Gaziantep, (2006).

Apak, R., Güçlü, K, Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu., Ber K.I., Özyurt, D., “Comparative evaluation of varius totalantioxidant capacityassays applied to phenolic compounds with the cuprac assay”, *Moleculs*, 12, 1496-1547 (2007).

Aruoma O.I., Halliwell B., “Superoxide-dependent and ascorbatedependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron: Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl radical generation”, *Ibid.*, 241, 273-278, (1987).

Aruoma, O.I., Cuppett, S.L., “Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept”, *AOCS Press, Champaign, Illinois*, p241, (1997).

Aruoma O.I., “Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease”, *JAACS*, 75, 199-212, (1998).

Asad, N.R., Asad, L.M.B.O., Bonacossa de Almeida, C.E., Felzenszwalb, I., Cabral-Neto, J.B., Leitão, A.C., “Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the E. coli genome”, *Genetics and Molecular Biology*, 27, 291-303 (2004).

Belitz, H.D., Groosch, W., Schieberle, P., “Food Chemistry”, *3 rd revised ed.*, *Springer*, Berlin, (2004).

Benavente-Garcia, O., Casillo, O., Marin, F., Ortuno, A., Del-Rio, J., “Uses and properties of citrus flavonoids”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505–4515, (1997).

Berlett, B.S., Stadtman, E.R., “Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stres”, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313–20316, (1997).

Birnboim H.C., Kanabus-Kaminska M., “The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide anion involve a metabolic process”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 82, 6820-6824, (1985).

Boyer, J., Liu, R.H., “Apple phytochemicals and their health benefits”, *Nutrition Journal*, 3, 5, (2004).

Bonnefont, R.D., Bastard, J.P., Janbdon, M.C., Delattre, J., “Consequences of the diabetic status on oxidant/antioxidant balance”, *Diabetes and Metabolism*, 26, 163–176, (2000).

Boğa, M. “Türkiye’de yetişen *vinca* türlerinin antioksidan aktivitelerinin tayini”, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul, (2007).

Brown, A.G., “Apples, Advances in fruit Breeding, Edt: J. Janick and J.N. Moore”, *Purdue Univ. Press*, Lafayette, Indiana, 3-37, (1975).

Burtis, C., Ashwood, E., “Tietz Textbook of Clinical Chemistry”, *Saunders Company*, Philadelphia, Pennsylvania, (1999).

Burak M., Çimen Y., “Flavonoidler ve Antioksidan özellikler”, *Journal of medical sciences*, (1999).

Budak, N.H., Doguc, D.K., Savaş, Ç.M., Seydim, A.C., Kök-Tas, T., Ciriş, M.I., Güzel- Seydim, Z.B., “Effects of Apple Cider Vinegars Produced with Different Techniques on Blood Lipids in High-Cholesterol-Fed Rats”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (12), 6638-6644, (2011).

Burdurlu, H., Koca, N. ve Karadeniz, F., “Meyve sularında biyoaktif bileşenler ve antioksidan aktivitesi”, *Dünya Gıda*, 6, 62-66, (2005).

Can, A., Özçelik, B. ve Güneş, G., “Meyve sebzelerin antioksidan kapasiteleri”, Et:03.06.2012, [http://ziraat.harran.edu.tr/kongre/Bildiriler/1458\\_AsliCAN.pdf](http://ziraat.harran.edu.tr/kongre/Bildiriler/1458_AsliCAN.pdf), *GAP IV. Tarım Kongresi*, Şanlıurfa, (2005).

Cam, M. ve Hışıl, Y., “Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri”, *3. Gıda Mühendisliği Kongresi*, Ankara, s67-82, 2-4 Ekim, (2003).

Cemeroglu, B., Yemenicioglu, A., Özkan, M., “Meyve ve Sebzelerin Bileşimi ve Sogukta Depolanmaları, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi”, *1. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:24*, Ankara, (2001).

Cheeseman K.H., Slater, T. F., “An introduction to free radical biochemistry”, *British Medical Bulletin*, 49, 481-493 (1993).

Cicerali, N.I., “Effect of Stress on Antioxidant Defense Systems of Sensitive and Resistant Cultivars of Lentil (*Lens culinaris* M) ”, *Yüksek Lisans Tezi*, ODTÜ, Ankara, (2004).

Cochrane C.G., “ Cellular injury by oxidants”, *Am J Med*, 30:91, 23-30, (1991).

Cotelle, N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou, E.M., “Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones”, *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43, (1996).

Cross, C.E., Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M., Harmon D., “Oxygen radicals and human disease”, *Ann. Intern Med*, 107, 526-545 (1987).

Çavdar, A.O., Babacan, E., Ünal, E., Gözdaşoğlu, S., Yavuz, G., Pamir, A., İkinciogullari, A., Dinçer, N., “Zinc status in pediatric Hodgkin's disease (HD) in Turkey: Possible impact on the immune system”, (1997).

Çimen, M.B.Y., “Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri”, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304, (1999).

Citoğlu, G.S., Çoban, T., Sever, B. ve İşcan M., “Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey”, *J. Ethnopharmacol.*, 92, 275-280 (2004).

Davies, K.J.A., “Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems”, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 279-289, (2000).

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., “Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress”, *International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine*, 329, (2003).

Dawn, B., Allan, D., Colleen, M., “Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach”, *Lippincott Williams & Wilkins Baltimore*, Maryland, (1996).

Dawidowicz, A.L., Wianowska, D. and Baraniak, B., “The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts)”, *LWT Food Science and Toxicology*, 39(3), 308-315, (2006).

Devaraj, S., Jialal, I., “The effects of alpha-tocopherol on critical cells in atherogenesis”, *Current Opinion in Lipidology*, 9, 11-15, (1998).

Dillard, C.J. ve German, J.B., “Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health”, *J. Sci Food Agric.*, 80, 1744-1756, (2000).

Durmaz, G., “Kayısı meyvesinin ve kavrulmuş kayısı çekirdeğinin antioksidan özellikleri”, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Malatya (2002).

Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H., “Antioxidant activity of fresh apples”, *Nature*, 405, 903-904, (2000).

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., “Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance”, *Mutation Research*, 567, 1–61, (2004).

Fantal, A.G., “Reactive oxygen species in developmental toxicity; Review and hypothesis”, *Teratology*, 53, 96-217, (1996).

Feibo, W., “Four Barley Genotypes Respond Differently to Cadmium: Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Capacity”, *Environ. Exp. Bot.*, (2002).

Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C., “Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 649-671, (2008).

Floyd R., “Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia”, *FASEB J*, 4, 2587-2597, (1990).

Foo, L.Y., Porter, L.J., “The structure of tannins of some edible fruits”, *Journal Science Food Agricultural*, 32, 711–716, (1981).

Fridovich I., “The biology of oxygen radicals”, *Science*, 201, 875-880, (1978).

Fridovich I., “Biological effects on superoxide radical”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1-11, (1986).

Gök, V., Serteser, A., “Dogal antioksidanların biyoyararlılığı”, *3. Gıda Mühendisliği Kongresi*, Ankara, (2003).

Gökalp, H.Y., Çakmakçı, S., “Gıdalarda kısaca Oksidasyon: Antioksidantlar ve Gıda Sanayinde Kullanımları”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23, 174-192, (1992).

Grisham M.B., McCord J.M., “Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites, In: Physiology of oxygen radicals”, Edt: Taylor A.E., Malton S., Ward P.A., *American Physiology Society*, Bethesda, Maryland, USA, pp: 1-18, (1986).

Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., “Antioxidants in Nutrition, Health and Disease”, *Oxford University Press*, New York, (1994).

Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., “The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems”, *Trends Biochem. Sci.*, 15, 129-135, (1990).

Gutteridge J.M.C., Halliwell, B., “Antioxidants in Nutrition, Health and Disease”, *Oxford University Press*, New York, (1994).

Gülçin, İ., “Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of Ltyrosine and L-Dopa”, *Amino Acids*, 32, 431–438 (2007).

Gülçin, İ., “The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499, (2005).

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., “Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.)”, *European Food Research and Technology*, 223, 759–767, (2006a).

Gülçin, İ., “Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine”, *Life Sciences*, 78, 803–811, (2006b).

Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., “Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-hederagenin”, *Phytotherapy Research*, 20, 130–134, (2006c).



Günaydın, B., Çelebi, H., “Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkileri”, *Anestezi Dergisi*, 11, 87-98 (2003).

Gülçin, İ., “Isırğan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi”, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, s114, (2002).

Gündüz, M., “Yumuşak Çekirdekli Meyveler Dünya Ticareti ve Türkiye Açısından Değerlendirme”, *Yumuşak Çekirdekli Meyveler Sempozyumu*, Yalova, 295-304, (1997).

Gümrükçüoğlu A., “Fonksiyonel grup taşıyan monodispers poli(glisidil metakrilat) mikrokürelere ile sıçan kanında *in vitro* fagositik aktivitenin ölçülmesi”, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, s52, (2002).

Halliwell, B., “Free Radicals and antioxidants: A Personal View”, *Nutr. Rev.*, 52, 253-265 (1994).

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., “Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease”, *Biochem. J.*, 219, 1-14, (1984).

Halliwell B., Gutteridge J.M.C, Aruoma O.I., “The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals”, *Anal. Biochem.*, 165, 215-219, (1987).

Halliwell B., Clement M.V., Long L.H., “Hydrogen peroxide in the human body”, *FEBS Lett*, 486, 10-13, (2000).

Halliwell B., “Antioxidant characterization: Methodology and mechanism”, *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1341-1348, (1995).

Halliwell, B., "Antioxidant in human health and disease", *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50, (1996).

Halliwell, B., Aruoma. O.I., "Free radicals and antioxidants: The need for invivo Markers of Oxidative stress", *Journal of American Oil Chemistry Society*, 75, 199–212, (1998).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., "Free radicals in Biology and Medicine", *Clarendon press*, Oxford, 238-240, (1989).

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview", *Methods Enzymol.*, 186,1-85, (1990).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., "Free Radicals In Biology and Medicine", *Oxford: Oxford Press*, (1999).

Haigh, R., "Safety and necessity of antioxidants: EEC approach", *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1031–1036, (1986).

Haugaard, N., "Cellular mechanism of oxygen toxicity", *Physiology Review*, 48, 311-373, (1968).

Heinecke, J.W., "Oxidized amino acids: Culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress", *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 1090-1101, (2002).

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383 (1992).

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., “Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study”, *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386, (1995).

Hirano, T., Gotoh, M., Oka, K., “Natural flavonoids and lignans are potent cytostaticagents against human leukemic HL-60 cells”, *Life Science*, 55, 1061–1069, (1994).

Hoffman R.M., Garewal H.S., “Antioxidants and the prevention of coronary heart disease”, *Arch Intern Med.*, 155, 241-246, (1995).

Huysen E.S., “Free Radikal Chain Reactions”, *John Wiley and Sons Inc.*, (1970).

Kaul, N., Devaraj, S., Jialal, I., “ $\alpha$ -tocopherol and atherosclerosis”, *Experimental Biology and Medicine*, 226 (1), 5–12, (2001).

Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., “Biyokimya”, Aktif Yayınevi, Erzurum, (2000).

Keskin, H., Erkmen G., “Besin Kimyası”, Güray Matbaacılık, Beşinci Basım, İstanbul, (1987).

Kılınç, A., “Oksijen Toksisitesinin Arac. Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110-118, (2002).

Kim, D.O., Lee, C.Y., “Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 253-273 (2004).

Kneepkens, C.M., Lepage, G., Roy, C.C.”, The optential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation”, *Free Radical Biology and Medicine*, 17,127–160, (1994).

Köksal, E., “Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi” *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, (2007).

Kulkarni, S.D., Tilak, J.C., Acharya R., Rajurkar, N.S., Devasagayam, T.P.A., Reddy, A.V.R., “Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as an aunction of growth under different conditions”, *Phytotherapy Research*, 20, 218–227, (2006).

Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti-Panici, P., Scambia, G., Mancuso, S., Capelli, A., Ranelletti, F., “Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids”, *British Journal of Hematology*, 75, 489–495, (1990).

Lea, A.G.H., Arnold, G., ”The phenolics of ciders: bitterness and astringency”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29 (5), 478–483, (1978).

Levine R.L., “Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease”, *Free Radic Biol Med.*, 32, 790-796, (2002).

Loeckie, L., De zwart, John H., ”Biomarkers of free radical ramage applications in expremental animals and in human”, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 202-226, (1999).

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P., “Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves”, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43, 1813-1819, (1995).

McCord J.M., Fridovich I., “Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)”, *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055, (1969).

McCord J.M., “Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury”, *N Eng J Med*, 312, 159-163, (1985).

Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwami K., “Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid”, *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210–214, (1966).

Miller, N.J., Paganga, G., “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids”, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956, (1996).

Moldovan, L., Moldovan, N.I., “Oxygen free radicals and redox biology of organelles”, *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 395-412, (2004).

Namiki, M., “Antioxidants/antimutagens in food”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 273-3, (1990).

Nelson, D.L., Cox, M.M., “Principles of Biochemistry”, Edt: Harata, N., Yu, Xiong, Yang, Shixin, Egelma, *Freeman Publishers*, New York, (2004).

Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z.T., “Antioxidative activity of natural products from plants”, *Life Sci.*, 66, 709-723, (2000).

Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., “Antioxidizing component, musizin, in *Rumex japonicus* houtt”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 735-739, (1991).

Nordberg, J., Arner, E.S.J., “Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”, *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312, (2001).

Oke, M., Paliyath, G., “Biochemistry of Fruit Processing”, Edt: Hui, Y.H., *Food Biochemistry & Food Processing*, pp: 531-769, (2006).

Oyaizu, M. “Anti-oksидative activities of products of browning reactions prepared from glucosamine”, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315, (1986).

Özbek,S., “Özel Meyvecilik”, *Ç.Ü.Z.F. Yayınları No:128*, Adana, s486, (1978).

Öztürkci C., “Erzincan Yöresinde Yetiştirilen Sakkı Elmalarının Seleksiyon Yoluyla Islahı” *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, Van, (2007).

Papas, A.M., “Determinants of antioxidant status in humans”, *Lipids*, 31, 77-82, (1996).

Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., “Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil”, *Arquivos de Biologiae Tecnologia*, 40, 97–106, (1997).

Pacific, R.E., Davis, K.J.A., “Protein, lipit and DNA repair system in oxydative stress: the free radical theoryof aging revisited”, *Gerontology*, 37, 166–180, (1991).

Peng, Y., Liu, F., Peng, Y., Ye, J., “Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection”, *Food Chemistry*, 92 (1), 169-175, (2005).

Porter N.A., “Chemistry of lipid peroxidation”, *Methods Enzymol.*, 105, 273-282, (1984).

Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., “Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants”, Ed: Hudson B.J.F., *Elsevier*, Amsterdam, 17-192 (1990).

Pryor W.A., “Free radical reactions in biological systems, Free Radicals in biology”, Edt: Pryor W. A., *Academic Press*, New York, 1, 4-6, (1976).

Rice-Evans, C.A., Miller N.J., Paganga G., “Antioxidant Properties of Phenolic Compounds”, *Trends Plant Sci.*, 2 , 152-159, (1997).

Saldamlı, İ., Sağlam, F., “Vitaminler ve mineraller, Gıda Kimyası”, Edt: Saldamlı, İ., Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 337-398 (1998).

Sevanian A., Ursini F., “Lipid peroxidation in membranes and lowdensity lipoproteins: Similarities and differences”, *Free Radic. Biol Med.*, 29, 306-311, (2000).

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L., “Dietary polyphenols and the prevention of diseases”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306 (2005).

Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda M., “The toxicology and safety of apple polyphenol extract”, *Food and Chemical Toxicology*, 42 (6), 959–967, (2004).

Shahidi, F., "Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications", *AOCS Press, Champaign, Illinois*, 0-935315-77-2, (1996).

Shacter E., "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples", *Drug Metab Rev .*, 32, 307-326, (2000).

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent", *Methods of Enzymology*, 299, 152–178, (1999).

Singh, S., Singh R.P., "In Vitro Methods of Assay of Antioksidants: An Overview", *Food Reviews International*, 24, 392-415, (2008).

Slater T.F., Cheeseman K.H., Davies M.J., ProudfootK., Xin W., "Free radical mechanisms in relation to tissue injury", *Proc. Nutr. Soc.*, 46, 1-12, (1987).

Slater T.F., "Free radical mechanisms in tissue injury", *Biochem. J.*, 222, 1-15, (1984).

Southorn P.A., Powis G., "Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions", *Mayo Clin. Proc.*, 63, 381-389, (1988a).

Southorn P.A., Powis G., "Free radicals in medicine. II. Involment in human disease", *Mayo Clin. Proc.*, 63, 390-408, (1988b).

Stadtman, E.R., "Importance of individuality in oxidative stress and aging", *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597–604, (2002).

Stadtman E.R., Levine R.L., "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins", *Amino Acids.*, 25, 207-218, (2003).



Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H., “Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 7449-7454, (2002).

Tietz, N., “Clinical Guide to Laboratory Tests”, *Saunders Company*, Philadelphia, Pennsylvania, (1995).

Tripathi, R., Mohan, H., Kamat, J.P., “Modulation of oxidative damage by natural products”, *Food Chem.*, 100, 81-90, (2007).

Tüzün, Y., Garip, F., “E vitaminin dermatolojideki yeri”, *Dermatose*, 4, 96-98 (2005).

Türkoglu A., Duru M.E., Mercan, N., Kivrak İ., Gezer, K., “Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill”, *Food Chemistry*, 267–273, (2006).

Ülkümen, L., “Malatya’nın mühim meyve çeşitleri üzerine morfolojik, fizyolojik ve biyolojik araştırmalar”, *Ankara Yüksek Ziraat Enstitüsü*, (1937).

Ülkümen, L., “Bag-Bahçe Ziraatı”, *A.Ü.Z.F. Yayınları No: 128*, Erzurum, (1973).

Yavuzer, S., “Serbest oksijen radikallerinde karşı savunma sistemleri, Hücre-II. Oksijen Stres ve Hücre Hasarı”, *Tıpta Temel Bilimler Okulu*, Kızılcıhamam, (1993).

Yen, G.C., Chen, H.Y., “Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27–32, (1995).

Yokozawa T., Cheng C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G.I., Nishioka I., “Study on the inhibitory effect of tanins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical”, *Biochem. Pharmacol.*, 56, 213-222, (1998).

Young I.S., Woodside J.V., “Antioxidants in health and disease”, *J. Clin. Pathol.*, 54, 176-186, (2001).

Van Esch, G.J., “Toxicology of tert-butyl-hydroquinone (TBHQ)”, *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1063–1066, (1986).

Von Sonntag, C., “The Chemical basis of Radiation Biology”, *Taylor, Francis*, London, (1987).

Zhu, Q.Y., Hackman R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., “Antioxidative activities of along tea”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6929-6934, (2002).

Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell, K., “Tea flavanoids: Their functions, utilisation and analysis”, *Trends in Food Science & Technology*, 11, 152-162, (2000).

Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G., Maxwell, S.R.J., “Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids”, *Analytic Chemistry Acta*, 266, 265-277, (1992).

Winston, J.C., “Health-promoting properties of common herbs”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 491S-499S, (1999).

Williamson, G., Manach, M., “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 243–255, (2005).

Wong S.H.Y., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach Jr C.N., Sunderman Jr F.W., “Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct”, *Clin. Chem.*, 33, 214-220, (1987).

## **ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseride’da tamamladı. Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü’nden 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında, Erzinan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Bu tez çalışmasını 14/08/2012’de tamamlayarak kimya anabilim dalında biyokimya bilim dalında yüksek lisans öğrenimini bitirmiştir.