

T.C.  
Niğde Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

ALLANTOİN METABOLİZMASINA SAHİP BAZI BİTKİLERDE ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTENİN *in vitro* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

CİHAN DÜŞGÜN

Ocak 2015



T. C.  
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ALLANTOİN METABOLİZMASINA SAHİP BAZI BİTKİLERDE ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTENİN *in vitro* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

CİHAN DÜŞGÜN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU


Ocak 2015

**Cihan DÜŞGÜN** tarafından **Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU** danışmanlığında hazırlanan “**Allantoin Metabolizmasına Sahip Bazı Bitkilerde Antioksidan Aktivitenin *in vitro* Yöntemlerle İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Hasan AKGÜL, Gaziantep Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU, Niğde Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU, Niğde Üniversitesi



**ONAY:**

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 14/01/2015 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun 13/01/2015 tarih ve 29 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

**Cihan DÜŞGÜN**

## ÖZET

### ALLANTOİN METABOLİZMASINA SAHİP BAZI BİTKİLERDE ANTIOKSİDAN AKTİVİTENİN *in vitro* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

DÜŞGÜN, Cihan  
Niğde Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU

Ocak 2015, 55 sayfa

Allantoin pürin metabolizmasının son ürünüdür ve  $C_4H_6N_4O_3$  formülasyonlu kimyasal bir bileşiktir, üreidohidantoin-5 ya da glioksildiüreid olarak tanımlanmaktadır. Yüksek miktarlarda üre içerir. Allantoin cilt yumuşaması ve cilt hücrelerinin hızlı bir biçimde rejenerasyon göstermesinde aktiftir. Ayrıca allantoinin antioksidan özellik gösterdiği de bilinmektedir.

Bu çalışmada antioksidan kapasitenin allantoin düzeylerine bağlı olarak değişebilmesinden dolayı farklı düzeylerde allantoin içeren *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum* bitkileri belirlendi. Seçilen bitki örneklerinin etanol ekstraktlarının; radikal süpürme gücü, indirgeme gücü ölçümü, bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve  $\beta$ -karoten bleaching metodları kullanılarak *in vitro* analizler ile antioksidan aktiviteleri test edildi. Sonuçlar doğal standart antioksidan olan askorbik asit ile karşılaştırıldı.

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi. Bitki ekstraktlarında en yüksek antioksidan aktivitenin *Plantago major*'da olduğu saptandı. En düşük aktivitenin ise *Robinia pseudoacacia*'da olduğu

tespit edildi. Seçilen bitki örnekleri arasında *Plantago major* 'un yüksek düzeyde allantoin içermesinden dolayı en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşıldı.

*Anahtar kelimeler:* Allantoin, antioksidan, DPPH, CUPRAC, Beta karoten, radikal süpürme gücü, indirgeme gücü, *in vitro* analiz, *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum*.

## SUMMARY

### STUDY ANTIOXIDANT ACTIVITY BY *in vitro* METHOD IN SOME PLANTS WHICH HAS ALLANTOIN METABOLISM

DUSGUN, Cihan

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Zeliha SELAMOGLU

January 2015, 55 pages

Allantoin is the final product of purine catabolism and is chemical compound formulated  $C_4H_6N_4O_3$  and is also called 5-ureidohydantoin or glyoxyldiureide. It contains high level urea. Allantoin is active in skin-soothing and regeneration of skin cells. It also known to show antioxidant properties.

In this study, contained different levels allantoin of *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* and *Aesculus hippocastanum* were determined because of changing antioxidant capacity depend on levels of allantoin. Ethanol extract of selected plant samples were tested by 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method, cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), reducing power assay and  $\beta$ -carotene bleaching method as *in vitro*. The results were compared with Ascorbic acid which is natural antioxidant.

Antioxidant activity of plant extracts were observed to increase directly proportional to the concentration. Among plant extracts, the highest antioxidant activity was determined in *Plantago major*. The lowest antioxidant activity was determined in *Robinia pseudoacacia*. Among selected plant samples, it was obtained that *Plantago major* showed the highest antioxidant activity because of it is containing high level allantoin.



*Keywords:* Allantoin, antioxidant, DPPH, CUPRAC, beta karoten bleaching, reducing power, in vitro analyses, *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum*.

## ÖNSÖZ

Yükseköğrenimim sırasında ve bu tezin konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU'na,

Bitki örneklerinin toplanmasında ve teşhisinde yardımlarından ve desteğinden dolayı Gaziantep Üniversitesi, Botanik Anabilim dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Hasan AKGÜL'e,

Öğrenim hayatım boyunca bana her zaman sonsuz destek Ayfer TOSUN, Seda DÜŞGÜN ve Seren DÜŞGÜN'e,

Her zaman yanımda olan can dostlarım Mehmet DOĞAN ve Sinan GÜNDÜZ'e,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını benden esirgemeyen ve bana sabır göstermeyi başarabilen Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fuat GÜLHAN, Ali İmran KORKMAZ, Çağrı ÇOBAN ve Mustafa SEVİNDİK'e,

Değerli arkadaşlarım Soner KAYA, Burcu AYDIN, Arif Can ERDİK ve İbrahim Hakkı İŞLER'e,

Lisans eğitimim sırasında karşılaştığım tüm zorlukları birlikte aşım, bana destek olan ve bu dönemde de desteğini benden esirgemeyen sevgili kız arkadaşım Zeynep KARACİF'e,

Bu çalışmaya FEB2014/26 numaralı proje ile finansal destek sağlayan Niğde Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve çalışanlarına,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

**Ocak 2015**

**Cihan DÜŞGÜN**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	vi
ÖNSÖZ .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
BÖLÜM I GİRİŞ .....	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Serbest Radikaller .....	3
2.1.1 Reaktif oksijen türleri .....	4
2.1.2 Reaktif azot türleri .....	6
2.1.3 Reaktif kükürt türleri .....	7
2.1.4 Reaktif karbon türleri.....	7
2.2 Antioksidanlar.....	8
2.2.1 Endojen kaynaklı antioksidanlar.....	8
2.2.1.1 Enzimatik antioksidanlar .....	8
2.2.1.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar .....	10
2.2.2 Doğal antioksidanlar .....	10
2.2.2.1 Polifenolik bileşikler .....	11
2.2.2.2 Karotenoidler.....	13
2.2.2.3 Askorbik asit (C vitamini).....	13
2.2.2.4 Tokoferoller (E vitamini) .....	14
2.3 Allantoin ve Genel Özellikleri .....	15
2.4 Çalışmada Kullanılan Bitkiler Hakkında Genel Bilgiler .....	18
2.4.1 <i>Plantago lanceolata</i> L. ....	18
2.4.2 <i>Plantago major</i> L.....	20
2.4.3 <i>Platanus orientalis</i> L. ....	22
2.4.5 <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....	24
2.4.8 <i>Robinia pseudoacacia</i> L. ....	26
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD .....	28
3.1 Materyal .....	28
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler .....	28

3.1.2 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	28
3.1.2.1 DPPH radikal süpürücü aktivite tayini ile ilgili çözeltiler .....	28
3.1.2.2 CUPRAC metodu indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler .....	28
3.1.2.3 İndirgeme gücü tayini ile ilgili çözeltiler .....	29
3.1.2.4 $\beta$ -Karoten bleaching metodu ile ilgili çözeltiler.....	29
3.2 Metod.....	29
3.2.1 Örneklerin hazırlanması.....	29
3.2.2 Ekstrasyon (Özütleme) metodu .....	30
3.2.3 Antioksidan kapasitenin belirlenmesi.....	30
3.2.3.1 DPPH radikal süpürücü aktivite tayini.....	30
3.2.3.2 CUPRAC metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini.....	30
3.2.3.3 İndirgeme gücü tayini.....	31
3.2.3.4 $\beta$ -Karoten bleaching metodu tayini.....	31
BÖLÜM IV BULGULAR .....	32
4.1 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Bulguları .....	32
4.2 CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Bulguları .....	33
4.3 İndirgeme Gücü Bulguları .....	35
4.4 $\beta$ -Karoten Bleaching Metodu Bulguları .....	37
BÖLÜM V TARTIŞMA.....	40
KAYNAKLAR .....	44
ÖZGEÇMİŞ .....	54
TEZ KAPSAMINDA ÜRETİLEN ESERLER.....	55

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Flavonoidlerin iskelet yapıları .....	12
Çizelge 4.1. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,25-1 mg/mL) bitki etanolik ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri (%) .....	32
Çizelge 4.2. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,20-1 mg/mL) bitki etanol ekstraktlarının 450 nm'deki absorbanı .....	34
Çizelge 4.3. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,20-1 mg/mL) bitki etanol ekstraktlarının 700 nm'deki absorbanı .....	36
Çizelge 4.4. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (0,20-1 mg/mL) elde edilen etanol ekstraktlarının 490 nm'deki ilk absorbanının % inhibisyonu .....	38
Çizelge 4.5. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (0,20-1 mg/mL) elde edilen etanol ekstraktlarının 490 nm'deki son absorbanının % inhibisyonu .....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Serbest radikal .....	3
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması .....	8
Şekil 2.3. Flavonoidlerin karbon yapısı .....	11
Şekil 2.4. Askorbik asitin yapısı .....	14
Şekil 2.5. Tokoferollerin yapısı .....	14
Şekil 2.6. Allantoinin yapısı .....	15
Şekil 2.7. Ürikaz enzimi .....	15
Şekil 2.8. Hidroksiürat hidrolaz.....	16
Şekil 2.9. 2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-üreidoimidazolin dekarboksilaz.....	16
Şekil 2.10. Allantoin rasemöz.....	17
Şekil 2.11. <i>Plantago lanceolata</i> L. Bitkisinin genel görünümü.....	19
Şekil 2.12. <i>Plantago lanceolata</i> genel görünümü.....	19
Şekil 2.13. <i>Plantago major</i> L. Bitkisinin genel görünümü.....	20
Şekil 2.14. <i>Plantago major</i> genel görünümü.....	21
Şekil 2.15. <i>Platanus orientalis</i> bitkisinin genel özellikleri.....	23
Şekil 2.16. <i>Platanus orientalis</i> meyva genel görünümü.....	23
Şekil 2.17. <i>Aesculus hippocastanum</i> genel görünümü .....	25
Şekil 2.18. <i>Aesculus hippocastanum</i> meyva genel görünümü.....	25
Şekil 2.19. <i>Robinia pseudoacacia</i> çiçek ve meyva genel görünümü.....	27
Şekil 2.20. <i>Robinia pseudoacacia</i> bitkisinin genel görünümü .....	27
Şekil 4.1. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu .....	33
Şekil 4.2. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu .....	33
Şekil 4.3. Bitki ekstraktlarının 450 nm'deki absorbansı .....	35
Şekil 4.4. Bitki ekstraktlarının 450 nm'deki absorbansı .....	35
Şekil 4.5. Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbansı .....	37
Şekil 4.6. Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbansı .....	37
Şekil 4.7. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu.....	38
Şekil 4.8. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu .....	39
Şekil 4.9. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu .....	39

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta
$\sigma$	Sigma
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
$\bullet\text{CCl}_3$	Triklorometil radikali
$^1\text{O}_2$	Tekil moleküler oksijen
CAT	Katalaz
$\text{CCl}_4$	Karbon tetraklorür
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Amonyum asetat
$\text{CO}_2$	Karbon dioksit
$\text{Cu}^{2+}$	Bakır (II) iyonu
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Bakır (II) klorür dihidrat
CUPRAC	Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
$\text{Fe}^{3+}$	Demir (III) iyonu
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Demir (III) klorür heksahidrat
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSNO	S-nitrosoglutatyon
GSSG	Okside glutatyon
$\text{H}^+$	Hidrojen iyonu
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
$\text{H}_3\text{PO}_4$	Fosforik asit

HIU	5-hidroksi izoürat
$K_3Fe(CN)_6$	Potasyum heksasiyanoferrat (III)
LDL	Low density lipoprotein (Kötü kolesterol)
$LOO\bullet$	Lipid peroksil radikali
$N_2O_3$	Diazot trioksit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
$NO^+$	Nitrozil katyonu
$NO\bullet$	Nitrik oksit radikali
$NO_2^+$	Nitronyum iyonunu
$NO_2\bullet$	Azot dioksit radikali
$O_2\bullet^-$	Süperoksit radikali
$OH\bullet$	Hidroksil radikali
OHCU	2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-ureidoimidazoline
$ONOO^-$	Peroksinitrit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikloro asetik asit
UV	Ultraviole ışınlar



# BÖLÜM I

## GİRİŞ

Oksidatif metabolizma canlılar için temel mekanizmalardan biridir. Bu mekanizmanın bir yan etkisi olarak insan vücudunda bazı serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir. Bu ROT'nin hücre zarı lipidleri ve proteinleri, DNA ve enzimler üzerindeki etkileri günümüzde bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur (Carocho ve Ferreira, 2013). ROT'nin dengelenmemiş fazlalığı oksidatif stres, yaşlanma ve buna bağlı pek çok hastalığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Canlı organizmaların sahip olduğu antioksidan sistemler aracılığıyla ROT'nin zararlı etkileri en aza indirilebilmektedir (Burton ve Jauniaux, 2011). Organizmanın serbest radikallere karşı savunma mekanizması enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra dışarıdan alınan doğal antioksidanlar da serbest radikallerle mücadele önemli bir role sahiptir (Dröge, 2002). Normal şartlarda, vücut kendi doğal antioksidan sistemleri ile oksidanları zararsız hale getirebilmektedir. Bu antioksidan sistemler süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve albümin, ferritin gibi makromoleküller ve askorbik asit,  $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -karoten, glutatyon (indirgenmiş), ürik asit ve bilirubin gibi küçük moleküllerden oluşmaktadır (Farrugia ve Balzan, 2012). Yapılan pek çok bilimsel çalışma sonucunda antioksidan özelliğe sahip bileşenleri ayrı ayrı bilmek ve her bileşenin antioksidan kapasitesini belirlemek yerine bu bileşenlerin toplam antioksidan etkisinin belirlenmesinin daha önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Burton ve Jauniaux, 2011, Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artan ROT düzeylerinin lipid peroksidasyonu, yaşlanma ile ilişkili olarak kalp-damar hastalıkları, ateroskleroz, diyabet, iskemi/reperfüzyon hasarı, hipertansiyon, kanser, romatoid artrit ve ayrıca Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara sebep olduğu gösterilmiştir (S. Kumar, 2011, Rajendran vd., 2014, Valko vd., 2007). Serbest radikallerin hücrelerde oluşma mekanizmalarının, biyomolekülleri nasıl etkilediklerinin ve hücrelerin serbest radikallere karşı geliştirdikleri antioksidan savunma mekanizmalarının aydınlatılmasının, günümüzde bilinen veya bilinmeyen pek çok klinik olgunun patogenezisine ışık tutacağı düşünülmektedir (S. Kumar, 2011, Li vd., 2014).

Allantoin pürin metabolizmasının son ürünüdür (Braga vd., 2012). Yüksek miktarlarda üre içeren allantoin,  $C_4H_6N_4O_3$  formülasyonlu kimyasal bir bileşiktir ve ureidohidantoin-5 ya da glioksildiürid olarak tanımlanmaktadır (Puszynska-Tuszkanow vd., 2011). Allantoin cilt yumuşaması ve cilt hücrelerinin hızlı bir biçimde yenilenme göstermesinde aktiftir. Allantoin korneositlerin kaldırılmasında etkilidir. Bu işlemi korneosit hücrelerinin arasını gevşeterek ve korneositlerin diğer hücrelere yapışmasını sağlayan desmozomları kaldırarak gerçekleştirir (Kuş vd., 2009). Korneositler cilt yüzeyindeki en dış tabaka olan stratum corneum (boynuzsu tabaka) tabakasının %80'ini oluşturmaktadır. Bu katman hücrelerarası lipid tabaka içine gömülü, yassı ve keratinle dolu ölü hücreler olan, 10-15 tabaka korneositlerden oluşur (Ölçer ve Gönül, 2002). Allantoin kuru ve hasarlı hücreleri temizler, yüzeyin pürüzsüz, yumuşak ve parlak olmasını sağlar (Kuş vd., 2009). Allantoinin, hücre çoğalması (nekrotik doku çıkarılması) ve epitelleşmeyi (cilt büyüme) teşvik ettiği ve böylece yaralar ve yaralar üzerinde yeni sağlıklı doku büyümesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Allantoin, ayrıca deride tahrişi azaltmaya yardımcı olan özelliğe de sahiptir. Allantoinin yumuşatıcı ve yatıştırıcı özelliklerinin yanı sıra inflamasyonu azaltma yeteneği mevcuttur (Fu vd., 2006). Bu özelliklerinin yanı sıra allantoinin antioksidan etkisi de bilinmektedir (Kand'ar vd., 2006).

Bu çalışmanın amacı; Türkiye'de yaygın olarak yetişen ve allantoin içerdiği belirlenen *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum* bitkilerinin belirli sıcaklıkta kurutularak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktlarında antioksidan etkinin test edilmesidir. Literatürde güvenilirliği kanıtlanmış ve sıklıkla kullanılan; DPPH radikal süpürme gücü, indirgeme gücü ölçümü, bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) ve  $\beta$ -Karoten bleaching metodları kullanılarak *in vitro* analizler ile bitki ekstraktlarının antioksidan etkileri hakkında bilgi edinilmesi, kullanılan metodların optimum şartlarının belirlenmesi ve bu bitki örneklerinin analiz sonuçlarının rakamsal ve grafiksel olarak ifade edilmesi hedeflenmiştir.

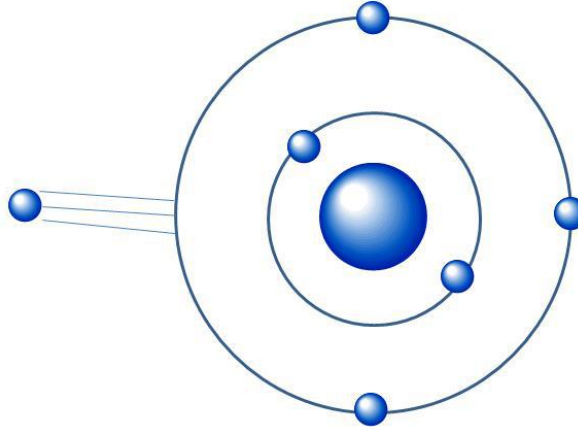
## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran moleküller olarak tanımlanmaktadır (Garg vd., 2012, U. Kumar vd., 2012, Mandade vd., 2011) (Şekil 2.1.). Serbest radikaller kararsız yapıdadır ve bir elektron alıp indirgenerek kararlı yapıya geçmek isterler. Bundan dolayı biyomembranlar, DNA, lipid, protein gibi biyolojik moleküllere saldırıp elektron alarak indirgenirler. Bu durum biyolojik moleküllere zarar vererek patolojik olgulara yol açabilmektedir (Koheil vd., 2011).

#### Serbest Radikal



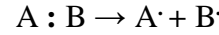
Şekil 2.1. Serbest radikal

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyon reaksiyonları vücuttaki antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer sirozu, kalp ve damar hastalıkları, damar tıkanıklığı, katarakt, inflamasyon ve diyabet gibi pek çok ciddi hastalığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Conforti vd., 2008).

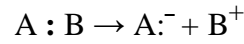
UV ışınlar, sigara dumanı, çevresel kirlilik, radyasyon, tarım ilaçlarının kalıntıları, endüstriyel çözücüler, iskemik dokuların reperfüzyonu, mitokondrilerde elektron transport zincirindeki oksijenin tam olarak indirgenememesi, mikroorganizmaların fagositler tarafından imha edilmesi, doymamış yağ asitlerinin metabolizması olan araşidonik asit metabolizması, inflamasyon, enfeksiyon, iltihap, virüsler, uyuşturucu ilaçlar, anestetik ilaçlar, stres ve heyecan gibi faktörler serbest radikal kaynakları olarak gösterilmektedirler (Farrugia ve Balzan, 2012, S. Kumar, 2011, Patil vd., 2010).

Serbest radikaller üç temel mekanizmayla oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1984, S. Kumar, 2011).

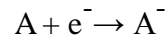
- Kovalent bağlı normal bir molekülün, ortak elektronlarının her birinde bir tanesinin kalarak homolitik bölünmesi sonucu oluşan radikaller:



- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı:



- Normal bir moleküle elektron eklenmesiyle ortaya çıkan radikaller:

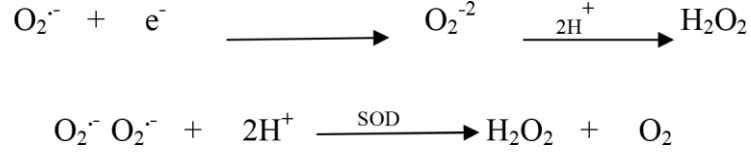


### 2.1.1 Reaktif oksijen türleri

İnsan vücudunda oksidatif strese yol açan başlıca temel serbest radikaller şunlardır;

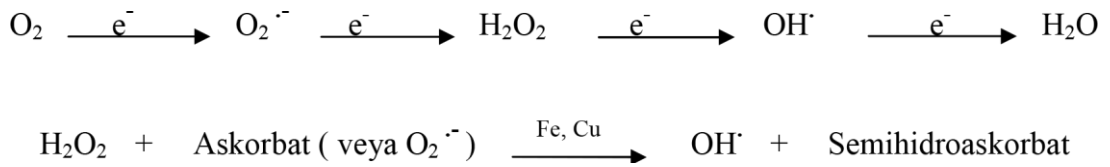
Süperoksit Radikali ( $O_2\cdot^-$ ): Mitokondri, önemli serbest radikal kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Süperoksit radikali, solunum sırasında mitokondride elektron transfer zincirinde elektron kaçağı ile  $O_2$ 'nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur (Farrugia ve Balzan, 2012). Eşlenmemiş bir elektron içerdiğinden dolayı hem çok fazla

reaktif hem de güçlü bir oksidan değildir. Süperoksit radikali hem indirgeyici hem de oksitleyici özelliğe sahip olduğundan doğrudan zararlı değildir. Bu radikal daha tehlikeli olan hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgeyici olması açısından önemlidir (Valko vd., 2007).



**Hidroksil Radikali (OH•):** Hidroksil radikali, serbest radikaller arasında en aktif olan moleküldür. İnsan vücudundaki her molekülü okside edebildiği için çok toksik ve çok tehlikelidir (Dröge, 2002). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar lipid peroksidasyonu ile hücre zarına verdiği zarardır. Hidroksil radikalının başlıca hedefi hücre zarındaki yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu, aterosklerozda önemli rol oynayan low density lipoprotine (LDL) zarar verir (Scheibmeir vd., 2005) ve zar yapısını bozup hücrenin geçirgenliğini artırarak hücrenin ölümüne sebep olur (Dröge, 2002).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in iki elektron alarak indirgenmesi sonucu su oluşur. Ama bir elektron alarak indirgenmesi sonucu OH• radikali oluşur. Bu indirgenme Fe ve Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda, oksitlenen metal iyonunu tekrar indirgendiğinden, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ten OH• yapımı sürekli bir duruma gelir.



**Lipid Peroksil Radikali (LOO•):** Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli radikal etkisiyle, zar yapısında bulunan konjuge olmayan polyunsaturated fatty acids (PUFA) zincir içindeki α-metilen gruplarında bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla başlar. Serbest radikal etkisiyle PUFA zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asiti zincirinin radikalleşmesine sebep olmaktadır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve birtakım değişikliklere uğrayarak molekül içi çift bağ aktarılması sonucu dienkonjugatlarını oluşturmaktadır. Çift bağların yeniden düzenlenmesinden sonra, lipid

radikali moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil adı verilen radikali meydana getirir ve antioksidanlarla redükte edilemez ise lipid peroksidasyon süreci başlar. Lipid peroksil, zar yapısındaki diğer PUFA'lara da etki ederek bir metilen hidrojen atomunu ayırır ve onunla birleşerek lipid hidroperoksitleri oluşturur. Bu arada yapısından hidrojen atomu ayrılan PUFA da ikinci bir lipid radikali haline geçer (Valko vd., 2007).

Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ): Hidrojen peroksit, oksijenin iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin dismutasyon tepkimeleriyle oluşur. Yapısında eşlenmemiş elektron bulunmadığından radikal özellik taşımaz. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü gibi davranmasıdır. Hidrojen peroksit membran lipoproteinleri ve doymamış yağ asitlerine karşı gösterdiği etkiler sonucunda hücrel hasara yol açar (Farrugia ve Balzan, 2012).

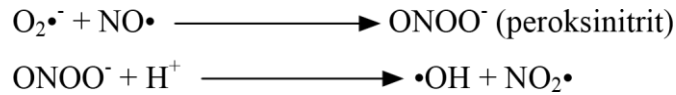
Tekil Oksijen ( $^1O_2$ ): Moleküler oksijenin orbitallerindeki herhangi bir elektron, bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde zıt kutuplara doğru döndüğünde tekil oksijen oluşmaktadır. Tekil oksijenin sigma ( $\sigma$ ) ve delta ( $\delta$ ) olarak adlandırılan iki formu bulunmaktadır. Sigma formunda zıt spinli elektronlar ayrı orbitallerde bulunurken, delta formunda ise zıt spinli elektronlar aynı orbitallerdedir. Tekil oksijen eşleşmemiş elektron içermediğinden dolayı radikal özellik göstermez. Fakat ROT arasında yer alır ve moleküler oksijenin aksine yarı ömrünün  $10^{-5}$ sn olmasından dolayı çok reaktiftir. Ultraviyole, radyasyon ve ozon gibi çevresel ajanlar tekil oksijen üretebilir. Bunun yanı sıra peroksil radikallerinin, peroksinitrit reaksiyonları ve  $H_2O_2$  reaksiyonlarının sonlandırılması, peroksidaz aracılı reaksiyonlar da tekil oksijen üretir. Tekil oksijen, çevresindeki çoklu doymamış yağ asitleri ve DNA'daki guanin bazı gibi moleküllerin çifte bağlarına bağlanır (Burton ve Jauniaux, 2011, Li vd., 2014).

### **2.1.2 Reaktif azot türleri**

Reaktif azot türleri; nitrik oksit ( $NO\bullet$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), diazot trioksit ( $N_2O_3$ ), S-nitrosoglutasyon ( $GSNO$ ), azot dioksit ( $NO_2\bullet$ ), nitrozil katyonu ( $NO^+$ ) gibi ilgili moleküllerden oluşmaktadır.

**Nitrik Oksit Radikali (NO•):** Memelilerde önemli bir hücrel sinyal iletimi molekülü olan nitrik oksit radikali (NO•), birçok fizyolojik ve patolojik süreçte görev alır (Huque vd., 2013). Radikal olan nitrik oksit L-arginin amino asitinden nitrik oksit sentaz enziminin katalitik etkisiyle oluşur. Ayrıca, makrofajlar tarafından da üretilen nitrik oksit, bağışıklık sisteminde de görev alır. Kan-beyin bariyerini geçerek düz kasların gevşemesinde ve damarlardaki kan basıncının düşürülmesinde önemli etkisi vardır. Nitrik oksit fazlalığı sitotoksik etkiye sahiptir (Kimura vd., 2002).

**Peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>):** Nitrik oksidin süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu oluşan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), nitrik oksidin toksisitesinden sorumlu başlıca bileşiktir. Oldukça güçlü bir yükseltgeyici ajan olup birçok biyolojik materyali doğrudan etkiler. Proteinlerdeki —SH gruplarını oksitleyerek doğrudan zarar verebilir. Ayrıca fizyolojik pH'da protonlanabilir ve güçlü bir lipid peroksidasyon başlatıcısı olan azot dioksiti (NO<sub>2</sub>•), hidroksil radikalini (HO•), fenilalanin, tirozin gibi aromatik halkaları, nitrolama ajanı olan nitronyum iyonunu (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) oluşturabilir (Sieracki vd., 2013).



### 2.1.3 Reaktif kükürt türleri

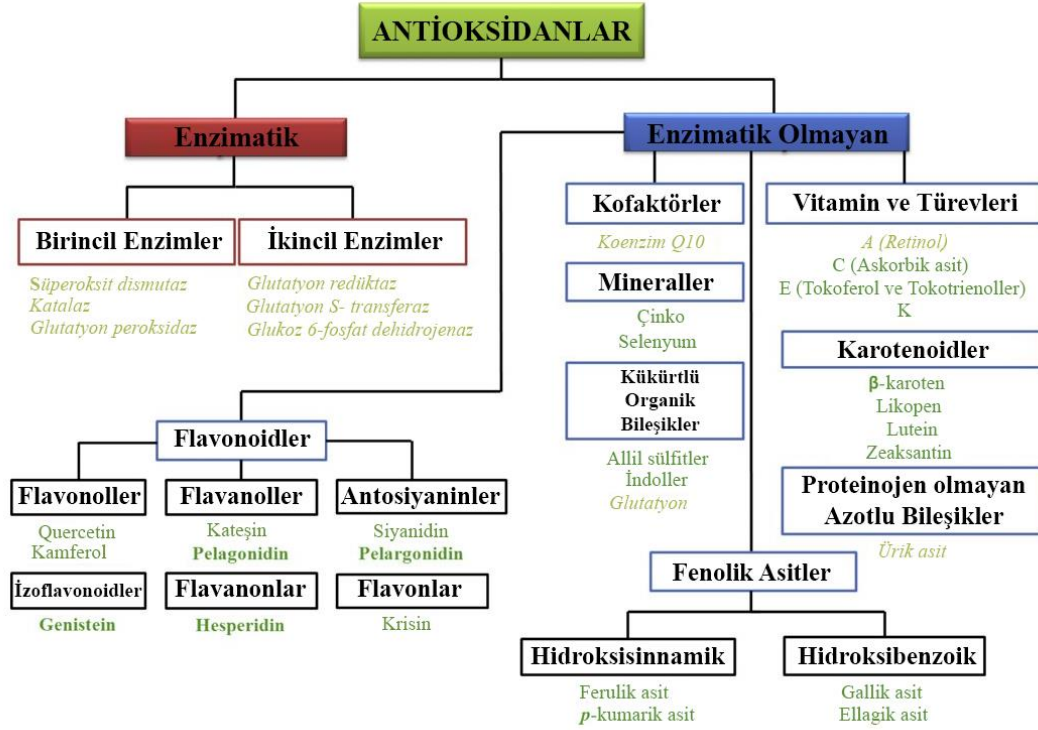
Sülfür merkezli radikallerdir. Tiyil radikalleri (RS•) ve alifatik tiyoller canlılarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bu alifatik tiyol grupları; toksik ajanlar, çeşitli enzimatik reaksiyonlar ve C-H bağlarının kopmasıyla oluşan C merkezli radikallerin (C•) ortadan kaldırılması için gerekli olan en iyi H atomu vericileridir. Tiyoller; karbonhidratlar, amino asitler ve lipidler gibi önemli biyomoleküllerin maruz kaldıkları serbest radikal saldırılarına karşı tiyil radikaline dönüşerek, söz konusu biyomolekülleri onarıcı birer ajan gibi davranırlar (Gruhlke ve Slusarenko, 2012).

### 2.1.4 Reaktif karbon türleri

Bu reaktif serbest radikallerin oluşumu, karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>)'e maruz kalmış dokularda gözlenmektedir. Sitokrom P<sub>450</sub> sistemi, oksijenle birlikte reaksiyona girerek

çeşitli serbest radikalleri meydana getiren triklorometil ( $\bullet\text{CCl}_3$ ) radikalini oluşturur (Madej vd., 2008).

## 2.2 Antioksidanlar



Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Carocho ve Ferreira, 2013)

(Sarı renkli yazılanlar endojen antioksidanları gösterirken, yeşil renkli olanlar eksojen antioksidanları belirtmektedir.)

### 2.2.1 Endojen kaynaklı antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.2.).

#### 2.2.1.1. Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz oksijenli solunum yapan canlılarda bulunmaktadır. Bu enzim süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene



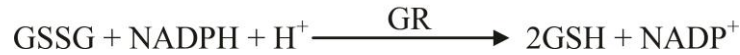
dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilmektedir (Carocho ve Ferreira, 2013).



Glutatyon peroksidaz (GSH-Px): Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksitlerin indirgenmesinde görev alan enzimdir. Tetramerik yapıda olup, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Glutatyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonları katalizlemektedir (Carocho ve Ferreira, 2013).



Glutatyon redüktaz (GR): Glutatyon redüktaz okside glutatyonun (GSSG) redükte formuna (GSH) indirgenmesinde rol oynar. Bu enzim, NADPH'a bağlı bir flavo enzimdir (Carocho ve Ferreira, 2013).



Katalaz (CAT): Katalaz, sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcut olup, 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Enzimin kararlılığı için her alt birim bir molekül NADPH içerir. Katalaz, esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğun olup karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksek aktivite göstermektedir. Bu enzimin esas görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir.



### **2.2.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar**

Melatonin: Lipofilik özellik göstermesinden dolayı bütün hücelere hatta hücelerin organellerine kadar ulaşarak geniş bir dağılım gösteren melatonin, hidroksil ve süperoksit radikallerini tutarak antioksidan etki gösterir (Aguilera vd., 2015).

Glutasyon (GSH): Karaciğerde sentezlenen bir tripeptittir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önler. Eritrositleri, lökositleri, göz lensini oksidatif hasara karşı korur (Farrugia ve Balzan, 2012).

Ubikinon (Koenzim Q): Ubikinon mitokondride elektron transport zincirinin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra düşük konsantrasyonlarda plazmada ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu engeller ve koruyucu bir antioksidan olarak görev alır (Bazil vd., 2014).

Bilirubin: Bilirubin, insan safrasına sarı rengi veren pigmentlerdir. Ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanması sonucu karaciğer tarafından dolaşımdan alınır ve biyotransformasyona uğrar, safra ve idrarla atılır. Peroksil radikallerini toplayarak antioksidan sisteme katkı sağlar (Qaisiya vd., 2014).

Ürik asit: Ürik asit (ürat) karbon, azot, oksijen ve hidrojenden oluşan ve formülü  $C_5H_4N_4O_3$  olan bir organik bileşiktir. Ürik asit, insanlarda pürin metabolizmasının son ürünü olarak ksantin oksidaz aktivitesiyle ksantinden oluşur. İnsanlarda pürin nükleositleri olan adenozin ve guanozin katabolizmasının temel ürünü olan ürik asit, antioksidan özelliklere sahiptir ve insan serumundaki serbest radikallerin %60'ının temizlenmesini sağlamaktadır. Etkin bir hücre dışı radikal tutucusu olan ürik asit metal bağlayıcı ve serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapmaktadır (Kand'ar vd., 2006).

### **2.2.2 Doğal antioksidanlar**

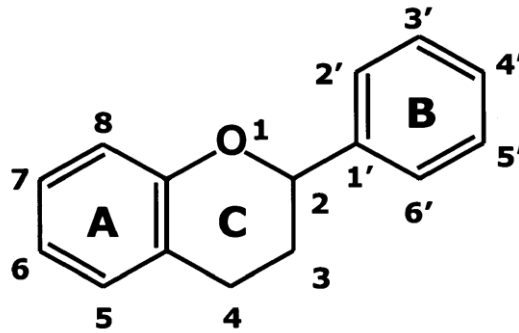
İnsan besininde ROT'ları temizleyebilen antioksidan aktiviteye sahip bileşikler bulunmaktadır. Diyetle alınan başlıca antioksidanlar karotenoidler, tokoferoller, C vitamini ve flavonoidlerdir. Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında bulunabilen fenolik ve polifenolik bileşikler şeklindedir.

### 2.2.2.1. Polifenolik bileşikler

Fitokimyasalların en geniş sınıflarından biri fenolik bileşiklerdir. Polifenollerin aktiviteleri, kimyasal yapılarındaki hidroksil gruplarına bağlıdır. Bundan dolayı da güçlü antioksidan özellik göstermektedirler. Bitkisel kaynaklı polifenoller; hidrojen atomu verici, tekil oksijeni süpürücü ve indirgeyici gibi birden fazla antioksidan özelliğe sahiptirler. Bazı polifenoller ise metal iyonlarını kelatlama kabiliyetleri ile antioksidan özellik göstermektedirler (Khan vd., 2014).

Besinlerin yapısında bulunan fenolik bileşikler; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar.

**Flavonoidler:** Sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' adını almışlardır ve 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) gösterirler. Bu yapılarından dolayı polifenolik bileşikler olarak kabul edilmektedirler (Şekil 2.3.). İskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavanon, biflavonoid, kalkon gibi türleri bulunmaktadır. (Formica ve Regelson, 1995).



Şekil 2.3. Flavonoidlerin karbon yapısı

Flavonoidler bitkisel besinlerde yaygın ve çok miktarda bulunan bileşiklerdir. Bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Bitkiler yaşamsal faaliyetleri için kullandıkları karbonhidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden flavonoidler gibi ikincil metabolitleri oluştururlar. Fenol benzopiran yapısı A, B, C halkalarından meydana gelmektedir. A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A'nın 3 molekülünün kondenzasyonu ile, B ve C halkaları ise yine glikoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil

propanoid bileşiklerinden oluşmaktadır. Şekil 2.2.'de görülen fenol benzopiron yapısında numaralarla gösterilen yerlerdeki karbon atomlarına hidroksil gruplarının bağlanmasıyla çok çeşitli flavonoidler meydana gelmektedir (Çizelge 2.1.).

**Çizelge 2.1.** Flavonoidlerin iskelet yapıları

<b>FLAVONLER</b>	<b>FLAVONOLLER</b>	<b>FLAVANONLAR</b>
Krisin	Quercetin	Naringenin
Apigenin	Rutin	Eriodiktol
Luteolin	Kamferol	Hesperidin
	Ramnetin	
<b>FLAVANOLLER</b>	<b>DİHİDROFLAVONOLLER</b>	<b>BİFLAVONOİDLER</b>
Kateşin	Taksifolin	Amentoflavon
Epikateşin	Slibin	

Bazı hidroksil gruplarına şeker, metil, sülfat ve benzeri grupların konjugasyonu ile bu flavonoidlerin konjugasyon ürünleri meydana gelmektedir ve sayılarının 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Örneğin bir flavonol olan quercetin'in 3. karbon atomuna bağlı hidroksil grubuna rutinozon konjugasyonu ile oluşan flavonoid, rutin flavonoid olarak adlandırılmaktadır (Sorata vd., 1984). Flavonoidler elma, soğan, baklagiller, hububat, domates, turunçgiller, çay ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır, bir insanın normal günlük diyetinde yaklaşık olarak 1g flavonoid bulunduğu tahmin edilmektedir (Elangovan vd., 1994).

Fenolik asitler: Fenolik asitler; sinamik asit ve benzoik asitin hidroksi türevleri olarak ikiye ayrılır. Hidroksibenzoik asitler C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> fenilmetan yapısında iken hidroksisinnamik asitler ise C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> fenilpropan yapısındadırlar. Yaygın olarak bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir (Baydar ve Baydar, 2013). Bu iki sınıf arasında ise çoğunlukla hidroksisinnamik asitler bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin %30'u fenolik asit şeklinde besin yolu ile alınmaktadır (Salgado vd., 2012). Fenolik asitler, hidroksi ve metoksi gruplarının bağlanma noktalarına ve çeşitlerine göre farklı şekilde adlandırılmaktadırlar.

Fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi, yapılarındaki aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının sayısı ve yerlerine göre değişiklik göstermektedir. Fenolik asitlerin metal kelatlama, hidroksi, peroksil, peroksinitrit ve süperoksit anyon radikallerini giderme

etkisine sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmaktadır (Ramkissoo vd., 2013, Zhang vd., 2011).

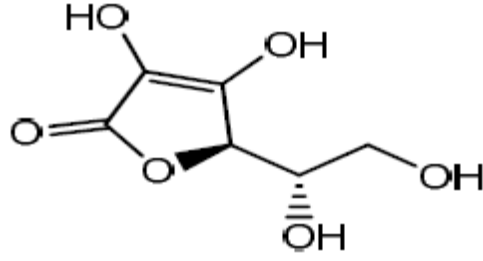
Fenolik polimerler (tanenler): Fenolik polimerler (tanenler veya proantosiyanidinler), yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerlerdir. Flavonoidlerin (flavan-3-ol) oligomer veya polimer yapısında olup bitkilerin ikincil metabolitleridir ve bitkileri zararlılara (mantarlar ve böcekler v.s) karşı korurlar (Y. J. Kim vd., 2008). Fenolik polimerler bazı ilek türlerinde, elmada, nar suyunda, kırmızı ve beyaz zmde, bunlardan elde edilen şaraplarda, yine bunların tohumlarında, kakao, çay, tarçın ve *Ginkgo biloba*'da bol miktarda bulunan koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir.

#### **2.2.2.2. Karotenoidler**

Karotenoidler bitkilerde ve hayvansal dokularda bulunan ve yağda çözünen kırmızı-sarı pigmentler olup havuç, kayısı, kavun, domates gibi meyve ve sebzelerin renklerinin kaynağıdırlar. Karotendioksigenaz, karotenin merkezindeki çift bağı kopararak A vitaminine dönüştürür. Gıdalarda bulunan karotenoidler, sekiz izoprenoid biriminin bir araya gelmesiyle oluşan  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen, lutein ve  $\beta$ -kriptoksantin olarak sınıflandırılan likopen türevi polienlerdir. Karotenoidler güçlü bir tekil oksijen süpürücü etki gösterip hücre ve diğer vücut komponentlerini serbest radikallerin saldırılarından koruyarak zincir reaksiyonlarını sonlandırırlar (Kljak ve Grbeřa, 2015).

#### **2.2.2.3. Askorbik asit (C vitamini)**

Özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunan L-askorbik asit suda çözünen bir vitamindir ve bitkilerin yaprak kısımlarında, özellikle kloroplastlarında yer almaktadırlar (şekil 2.4.). Meyveler arasında en çok portakal, limon, greylfurt, domates, ananas, ilek ve frenk üzümünde bulunmaktadır. Bunlara oranla elma, kiraz, armut ve erik daha az miktarda C vitamini içermektedir. Özellikle turunçgillerin ve domatesin i kısımlarından ziyade kabuk kısımları C vitamini bakımından daha zengindir. Sebzelerden ise özellikle karnıbahar, lahana, ıspanak, kuru soğan, biber, tere, maydanoz ve yer elması C vitamini bakımından en zengin kaynaklardandır (Falowo vd., 2014).



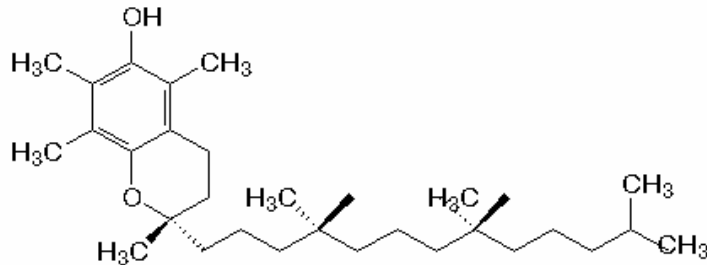
Şekil 2.4. Askorbik asitin yapısı

Askorbik asit tekil oksijeni süpürerek lipid peroksidasyonu sonucu oluşan peroksi serbest radikalini temizler.

C vitamini pekçok hayvanın karaciğer ve böbreklerinde glikozdan sentezlenir. Fakat insanlarda L-glukanolakton oksidaz bulunmadığı için bu vitamin sentezlenemez. Bu sebeple bu vitamin dışarıdan besin yoluyla alınmak zorundadır (Hongyan vd., 2012).

#### 2.2.2.4. Tokoferoller (E vitamini)

Doğada E vitamininin sekiz formu bulunmaktadır ve hepsi 6-hidroksikroman halka sistemine sahiptir. Dört tokoferol ve dört tokotrienol yapı bulunur. Tokoferoller:  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol ve  $\delta$ -tokoferol ve tokotrienoller:  $\alpha$ -tokotrienol,  $\beta$ -tokotrienol,  $\gamma$ -tokotrienol ve  $\delta$ -tokotrienol'dür. Tokoferoller, 6-hidroksikroman halkasına bağlı fitil grubuna sahiptir (Şekil 2.5.). Tokotrienollerde ise izopren biriminden oluşan bir yan zincir mevcuttur (Bruno ve Mah, 2014).



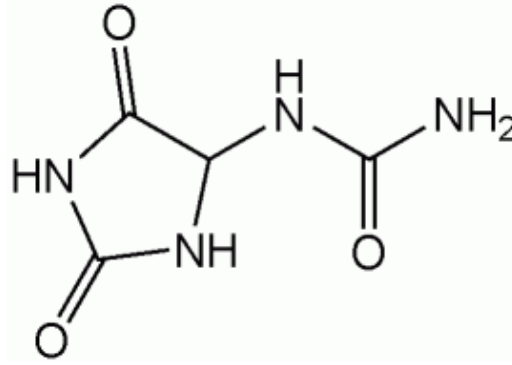
Şekil 2.5. Tokoferollerin yapısı

Özellikle süt, yumurta ve karaciğer E vitaminince zengin hayvansal kaynaklardır. Yeşil yapraklı sebzeler, bitkisel yağlar, baklagiller, ceviz ve fındık ise E vitaminin başlıca bitkisel kaynaklarıdır.  $\alpha$ -tokoferol en fazla antioksidan etkiye sahip doğal bileşiklerden

birisidir. Tokoferoller yapılarındaki hidroksil gruplarının hidrojenini lipid peroksil radikaline aktarır serbest radikalleri ve lipid peroksil radikallerini temizleyerek antioksidan etki göstermektedirler (Dasgupta ve Klein, 2014).

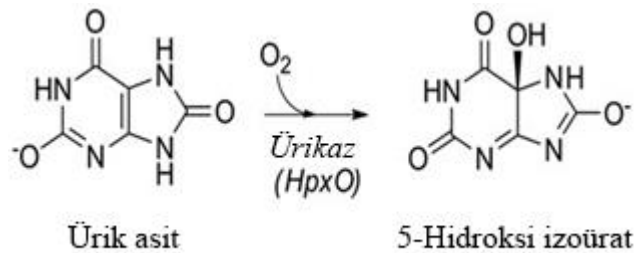
### 2.3 Allantoin ve Genel Özellikleri

Pürin metabolizmasının son ürünü olan allantoin  $C_4H_6N_4O_3$  formülasyonlu bir bileşiktir (Şekil 2.6.). ve ureidohidantoin-5 ya da glioksildiüroid olarak da tanımlanmakta olup (Braga vd., 2012) yüksek miktarlarda üre içermektedir (Puszynska-Tuszkanow vd., 2011).



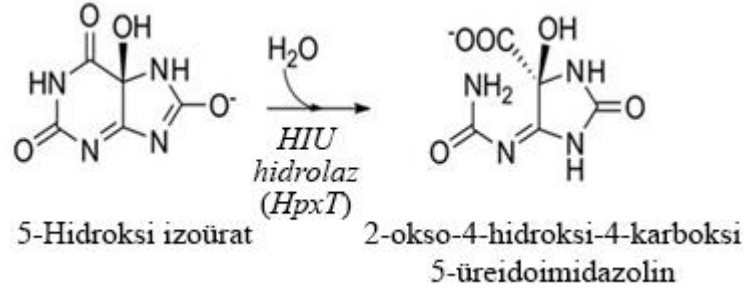
Şekil 2.6. Allantoinin yapısı

Allantoin metabolik yolunun ilk aşaması; üç enzim içerir ve bu enzimler ürik asidin allantoinine oksitlenmesini kolaylaştırır. Ürat oksidazla ürik asidin allantoinine oksidayonunda ek olarak 5-hidroksi izoürat (HIU) hidrolaz ve 2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-üreidoimidazolin (OHCU) dekarboksilaz enzimleri de bulunur (Kwangsoo vd., 2007). Ürik asit, ürikaz ve  $O_2$  ile reaksiyona girerek bir ara ürün olan 5-hidroksi izoüratı oluşturur (Şekil 2.7.).



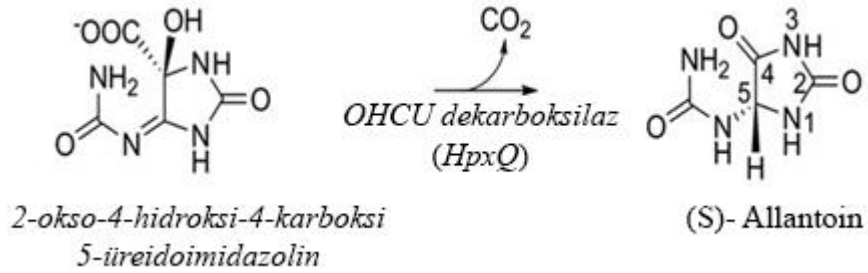
Şekil 2.7. Ürikaz enzimi

Reaksiyon sonucu oluşan 5-hidroksi izoürat, 5-hidroksi izoürat hidrolaz enzimi ve H<sub>2</sub>O ile reaksiyona girerek 2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-üreidoimidazolin meydana gelir (Şekil 2.8.).



**Şekil 2.8.** Hidroksiürat hidrolaz

Meydana gelen son ara ürün olan 2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-üreidoimidazolin ile 2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-üreidoimidazolin dekarboksilaz reaksiyona girerek allantoin oluşur ve bu reaksiyon sonucunda CO<sub>2</sub> çıkışı gerçekleşir (Şekil 2.9.).

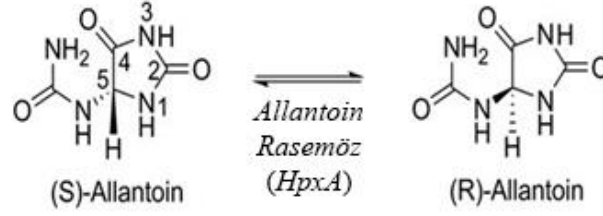


**Şekil 2.9.** 2-okso-4-hidroksi-4-karboksi-5-üreidoimidazolin dekarboksilaz

Allantoinin 3 yapısal konformasyonu kristal, hitherto ve rasemöz yapıdır. Kristal ve hitherto yapı hakkında çok fazla bilgiye sahip olunmasa da rasemöz yapı iyi şekilde aydınlatılmıştır (Kwangsoo vd., 2007).

Allantoinin bir kiral merkezi vardır ve bu merkez R- ve S-enantiomerik formlarda (Şekil 2.10.) mevcut olabilir (Kim vd., 2009). (S) enantiomer enzimatik bozunma ürünüdür. (S) enantiomer ise hem HIU hem de OHCU'un enzimatik olmayan bozunması ile de oluşur (Şekil 2.9.).





**Şekil 2.10.** Allantoin rasemöz

Allantoin cilt yumuşaması ve cilt hücrelerinin hızlı bir biçimde yenilenme göstermesinde aktif olup korneositlerin kaldırılmasında etkilidir. Bu işlemi korneosit hücrelerinin arasını gevşeterek ve korneositlerin diğer hücelere yapışmasını sağlayan desmozomları kaldırarak gerçekleştirir (Kuş vd., 2009). Korneositler cilt yüzeyindeki en dış tabaka olan stratum corneum (boynuzsu tabaka) tabakasının %80'ini oluşturmaktadır. Bu katman hücrelerarası lipid tabaka içine gömülü, yassı ve keratinle dolu ölü hücreler olan, 10-15 tabaka korneositlerden oluşur (Ölçer ve Gönül, 2002). Allantoin kuru ve hasarlı hücreleri temizler, yüzeyin pürüzsüz, yumuşak ve parlak olmasını sağlar (Kuş vd., 2009).

Yüksek maymunlar, sürüngenler, kuşlar ve diğer bazı hayvanlarda pürin katabolizmasının atılan son ürünü ürik asittir. Diğer birçok omurgalıda ise ürik asit, urat oksidaz etkisiyle allantoinine dönüşür; bazı balıklarda allantoin, allantoinaz etkisiyle allantoinik asite dönüştürülür; kurbağalarda ve kıkırdaklı balıklarda allantoinik asit, allantoinaz etkisiyle üreye dönüştürülür; deniz omurgasızlarında üre, üreaz etkisiyle amonyak ve karbondioksit parçalanır.

İnsan organizması ürikaz (ürik oksidaz) içermediğinden bu yıkımın son ürünü ürik asittir. Primatlar dışındaki memelilerde ürik asit; allantoinine, üre ve hatta amonyağa kadar parçalanabilir. İnsan ve gelişmiş maymunlar dışındaki tüm türlerde ürik asiti daha yüksek çözünürlüklü atık olan allantoinine dönüştüren enzim urat oksidaz bulunur (French vd., 2011).

Allantoinin, hücre çoğalması (nekrotik doku çıkarılması) ve epitelleşmeyi (cilt büyüme) teşvik ettiği ve böylece yaralar ve yaralar üzerinde yeni sağlıklı doku büyümesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Allantoin, ayrıca deride tahrişi azaltmaya yardımcı olan

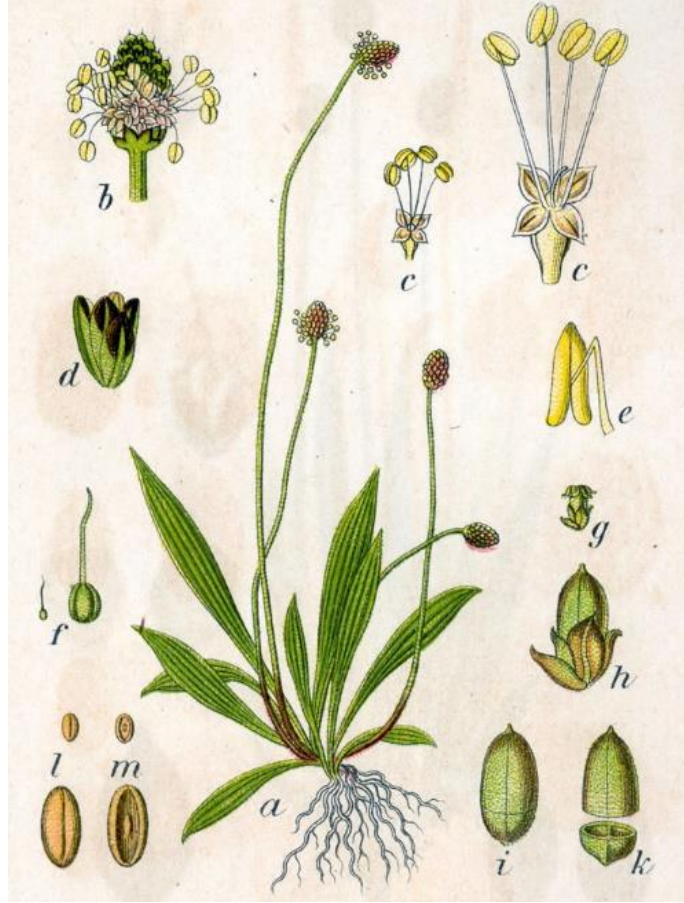
özelliğe de sahiptir. Allantoinin yumuşatıcı ve yatıştırıcı özelliklerinin yanı sıra inflamasyonu azaltma yeteneği de mevcuttur (Fu vd., 2006).

## 2.4 Çalışmada Kullanılan Bitkiler Hakkında Genel Bilgiler

### 2.4.1 *Plantago lanceolata* L.

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Asteridae
Ordo	: Plantaginales
Familiya	: Plantaginaceae
Genus	: <i>Plantago</i>
Species	: <i>Plantago lanceolata</i> L. (damar otu)

Plantaginaceae familyasına ait bir bitkidir. Halk arasında ince yapraklı damar otu olarak bilinmektedir. Tabanda çok sayıda rozet biçiminde yaprakları bulunan çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.11.). Yapraklar mızraksı ovat, mızraksı veya dar mızraksıdır. Yaprak kenarları düz veya düzensiz dişli, 3-5-7 damarlı, tüysüz, sapsız veya sap uzunluğu yaprak ayasının 1/3'ü kadardır (Şekil 2.12.). Çiçeklenme zamanı nisan-ekim aylarıdır. Deniz kıyılarında, kumlu sahillerde, çayırlarda, bataklıklarda, dere kenarlarında, koruluk alanlarda, *Pinus* ormanlarında, 1-3000 m yükseklik aralığında yayılış gösterir. Hemen hemen Türkiye'nin her yerinde yayılış gösterir (Davis, 1982).



**Şekil 2.11.** *Plantago lanceolata* L. Bitkisinin genel görünümü  
([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fa/Plantago\\_lanceolata\\_Sturm61.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fa/Plantago_lanceolata_Sturm61.jpg))



**Şekil 2.12.** *Plantago lanceolata* genel görünümü  
(<http://commondatastorage.googleapis.com/static.panoramio.com/photos/original/44853008.jpg>)

### 2.4.2 *Plantago major* L.

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Asteridae
Ordo	: Plantaginales
Familiya	: Plantaginaceae
Genus	: <i>Plantago</i>
Species	: <i>Plantago major</i> L. (damar otu)

Plantaginaceae familyasına ait bir bitkidir. Halk arasında derman otu, damar otu, katır kulağı, siğil yaprağı olarak adlandırılmaktadır. Çok yıllık bir bitkidir. Tabanda rozet biçiminde yapraklar bulunur. Yaprakları 5-9 damarlı, kalın, tüysüz ve eliptik ovat veya yuvarlak ovat şeklindedir (Şekil 2.13. ve Şekil 2.14.). Çiçeklenme haziran-ağustos aylarıdır. Bulunduğu habitat çamlıklar, sulanmış alanlar, kanallar, bataklıklar, kayalık dağların yamaçları ve genellikle tuzlu bölgeler. Deniz seviyesinden 2200 m'ye kadar yayılış gösterirler (Davis, 1982).



**Şekil 2.13.** *Plantago major* L. Bitkisinin genel görünümü  
([http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band4/tafel\\_072.jpg](http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band4/tafel_072.jpg))





**Şekil 2.14.** *Plantago major* genel görünümü  
([http://ograsradgivaren.slu.se/bilder/ogras/55\\_211\\_plantago\\_major\\_3.jpg](http://ograsradgivaren.slu.se/bilder/ogras/55_211_plantago_major_3.jpg))

*Plantago major*, benzoik asit, klorojenik asit, sitrik asit, ferulik asit, oleanolik asit, salisilik asit, ursolik asit, pektin, saponin, oksalik asit içerir (Bakker vd., 1998). Ayrıca allantoin içermektedir. *Plantago major*'un yaprak ve tohumları yara iyileşmesi aktivitesi de dahil olmak üzere, analjezik, antioksidan, zayıf antibiyotik, immünmodülatör, antiülserojenik, antiviral ve hepatoprotektif aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Adams vd., 2009, Velasco-Lezama vd., 2006). Ayrıca antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiseptik, idrar söktürücü, balgam söktürücü, hemostatik, müshil, astım, amfizem, mesane problemleri, bronşit, ateş, hipertansiyon, romatizma ve kan şekeri kontrolü için alternatif ilaç olarak kullanılır.

### 2.4.3 *Platanus orientalis*

Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Magnoliophyta
Ordo	: Proteales
Familya	: Platanaceae
Genus	: <i>Platanus</i>
Species	: <i>Platanus orientalis</i> (Doğu çınar)

Halk arasında doğu çınarı olarak bilinmektedir. Serbest büyüdüğü zaman kısa gövde, kalın dal ve geniş tepe yapar. Gövde ve dallar açık gri veya yeşilimsi gri renklidir. Yaşlı gövdelerin kabukları diğer türlerinkilere nazaran daha küçük levhalar halinde kalkar ve yavaş dökülür (Şekil 2.15.). Açık yeşil yapraklar 5-7 lopludur. Lobları çok derin, orta damara kadar ulaşan oyuntuları vardır. Bunların uzunlukları enlerinden daha fazla olduğu gibi, uçları da sivridir. Kenarları gelişi güzel kaba dişli veya düzdür. Tam gelişmiş yaprağın alt yüzü hemen hemen tüsüzdür. Genişliği 10-20 cm'ye ulaşan yaprağın 3-8 cm uzunluğunda dip tarafı huni gibi genişleyerek tomurcuğu içerisinde saklayan bir sapı vardır. Çiçeklenme zamanı mart-mayıs aylarıdır. 2-2,5 cm çapındaki birleşik meyveden 2-6 tanesi uzun bir sap üzerinde yer alır (Davis, 1982) (Şekil 2.16.).

*Platanus orientalis* bitkisinin yaprakları ilaç ve oftalmolojik ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kökü ise hemostatik ajan ve yılan ısırığına karşı panzehir olarak kullanılmaktadır. Yaprakları anti ülser aktivite göstermektedir. Bunun yanı sıra İbn-i Sina tarafından diş ağrısı, diz ağrısı için analjezik ve antiinflamatuvar olarak kullanıldığı bilinmektedir. Antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkisi vardır (Haider vd., 2012).





**Şekil 2.15.** *Platanus orientalis* bitkisinin genel özellikleri  
(<http://thestreetwork.files.wordpress.com/2011/10/platanus-orientalis.jpg>)



**Şekil 2.16.** *Platanus orientalis* meyva genel görünümü  
([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Platanus\\_orientalis\\_fruits,\\_Thasos.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Platanus_orientalis_fruits,_Thasos.jpg))

#### 2.4.5 *Aesculus hippocastanum* L.

Divisio	: Spermatophyta
Classis	: Dicotyledones
Subclassis	: Dialypetalae
Ordo	: Sapindales
Familya	: Sapindaceae
Genus	: <i>Aesculus</i>
Species	: <i>Aesculus hippocastanum</i>

*Aesculus hippocastanum* halk arasında at kestanesi olarak bilinmektedir. Parklarda ve yol kenarlarında sıklıkla yetiştirilen büyük bir ağaçtır. Vatanı Balkan yarımadası olan 15-25 m' e kadar boyda, sık dallı ve yapraklı ağaçlar olup yaprakları uzun saplı, palmat, 5-9 foliollü; foliolleri ters ovat veya baklava şeklinde, kenarları düzensiz dişlidir (Şekil 2.18.). Çiçek durumu dik piramit şeklinde çiçekler beyaz veya pembe renklidir. Ovaryumun gelişmesiyle önce yeşil renkli, yuvarlak ve üzeri dikenli kapsül tipinde bir meyva meydana gelir; olgunlaşınca dış kısmı esmerleşir, üç yarıkla açılır ve tohumları düşer. Tohumları büyüktür, kestane'ye benzer ve çok serttir (Şekil 2.17.). Olgun tohumları, Semen Hippocastani, triterpenik saponozitler içerir, bu bileşikler antienflamatuar, vazokonstrüktör ve kapiler çatlamayı önleyici özelliktedir. Ayrıca flavonozitler de bulunur, bu nedenle P vitamini aktivitesi gösterir. Bu drogdan hazırlanan preparatlar hemoroid ve damar hastalığı tedavisinde kullanılır (Tanker vd., 2004).





**Şekil 2.17.** *Aesculus hippocastanum* genel görünümü  
(<http://jardineries.jardiland.com/back-office/photos/87-aesculus-hippocastanum.jpg>)



**Şekil 2.18.** *Aesculus hippocastanum* meyva genel görünümü  
([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Aesculus\\_hippocastanum\\_%E2%80%94\\_Flora\\_Batava\\_%E2%80%94\\_Volume\\_v12.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Aesculus_hippocastanum_%E2%80%94_Flora_Batava_%E2%80%94_Volume_v12.jpg))

#### 2.4.8 *Robinia pseudoacacia*

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledones
Subclassis	: Dialypetalae
Ordo	: Rosales
Familya	: Leguminosae
Subfamilya	: Papilionaceae
Genus	: <i>Robinia</i>
Species	: <i>Robinia pseudoacacia</i>

*Robinia pseudoacacia* (akasya ağacı), vatanı Kuzey Amerika olduğu halde yurdumuzda çok kolay yetişen, dikenli ve boylu bir ağaçtır. Çiçekleri kirli beyaz renkli olup 25-30 cm boyunda, sarkık salkımlar oluşturur. Güzel kokulu olan bu çiçeklerden parfümeride kullanılan bir esans elde edilir. Yol kenarlarına gölge vermek için dikilir. Vatanı Çin olan bir başka bitki de *Wistaria sinensis*'tir (mor salkım). Tırmanıcı ve odunlu olan bu bitki Anadolu' da çardakları örtmek amacıyla dikilir; çiçekleri leylak renkli olup sarkık salkımlar meydana getirmiştir, yapraklardan önce açar. *Laburnum vulgare* (sarı salkım) da park ağacı olarak fakat diğer ikisinden daha az yetiştirilen bir Avrupa bitkisidir. Küçük bir ağaç formundadır. Çiçekleri sarı renkli ve sarkık salkımlar halindedir, bu nedenle bitkiye altın yağmuru adı verilmiştir. Bütün bitkide zehirli bir alkaloit olan sitisin bulunur; santral sinir sistemine etkilidir.



**Şekil 2.19.** *Robinia pseudoacacia* çiçek ve meyva genel görünümü  
([http://free-pu.t-com.hr/romeo-tomaz-biodiversity/piante\\_jpg/robinia\\_pseudoacacia.jpg](http://free-pu.t-com.hr/romeo-tomaz-biodiversity/piante_jpg/robinia_pseudoacacia.jpg))



**Şekil 2.20.** *Robinia pseudoacacia* bitkisinin genel görünümü  
([uploads/images/Gallery/yaprakli-agaclar/robinia\\_pseu\\_umbraculifera.jpg](uploads/images/Gallery/yaprakli-agaclar/robinia_pseu_umbraculifera.jpg))

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Bakır (II) klorür ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Amonyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), neokuprin, Fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), Demir (III) klorür ( $\text{FeCl}_3$ ), Potasyum hekzasiyanoferrat (III) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), Trikloro asetik asit (TCA), Trans-beta-karoten, linoleik asit, etanol, metanol, tween-20.

##### 3.1.2 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

###### 3.1.2.1 DPPH radikal süpürücü aktivite tayini ile ilgili çözeltiler

- 0,1 mM DPPH radikal solüsyonunun hazırlanması: 0,0079 g DPPH alınmıştır ve %95'lik 200 mL metanolde çözünmüştür.

###### 3.1.2.2 CUPRAC metodu indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

- 0,01 M'lık  $\text{CuCl}_2$  çözeltisinin hazırlanması: 0,1705 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  alınmıştır ve 100 mL distile suda çözünmüştür.
- 1 M pH:7  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  tamponunun hazırlanması: 7,708 g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  alınıp, 90 mL distile su ile çözünüp pH 7'e ayarlanmıştır. Distile su ile son hacim 100 mL'e tamamlanmıştır.
- 7,5 mM'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 0,1562 g neokuprin alınmıştır ve 100 mL etanolde çözünmüştür.

### 3.1.2.3 İndirgeme gücü tayini ile ilgili çözeltiler

- 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 13,48 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> alınıp, 980 mL distile su ilave edilip pH 6,6'e ayarlanmıştır. Distile su ile son hacim 1 litreye tamamlanmıştır.
- %0,1'lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisinin hazırlanması: 0,1666 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O alınmıştır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür.
- %1'lik K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisinin hazırlanması: 1 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> alınmıştır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür.
- %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA alınmıştır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür.

### 3.1.2.4 β-Karoten bleaching metodu ile ilgili çözeltiler

- 2 mg kristal trans-beta-karoten, 10 mL kloroform içinde çözülerek stok beta-karoten çözeltisi hazırlanmıştır.
- 250 mL'lik yuvarlak tabanlı bir balona; 40 µL linoleik asit ve emülgatör olarak 500 µL tween-20 konularak üzerine beta-karoten çözeltisinden 1 mL eklenip ve hızla karıştırılarak balon içeriğinin homojen bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Kloroform rotary evaporatörde 40 °C'de vakum altında 5 dakika uzaklaştırılmış, balona 100 mL distile su, yavaşça konularak ve kuvvetlice çalkalanarak tam bir emülsiyon oluşması sağlanmıştır.

## 3.2 Metod

### 3.2.1 Örneklerin hazırlanması

Bitki örnekleri Gaziantep Üniversitesi kampüs alanından Mayıs 2013 tarihinde toplandı ve Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü herbaryumunda örneklenerek Doç. Dr. Hasan AKGÜL tarafından botanik tanımlanması ve adlandırılması yaptırıldı. Bitki örnekleri tanımlaması yapıldıktan sonra distile su ile yıkanarak

kirlerinden arındırıldı. Temizlenen örnekler gölgede kurutulduktan sonra blender ile parçalanarak analize hazır hale getirildi.

### **3.2.2 Ekstrasyon (Özütleme) metodu**

Kurutulmuş ve öğütülmüş bitki örneklerinin 30 gramı soxhlet haznesine yerleştirildi ve etanol ile 6 saat ekstrakt çıkarma işlemi yapıldı. Özüt süzöldükten sonra etanol vakum altında rotary evaporatörde 40 °C’de buharlaştırıldı ve analiz edilinceye kadar +4 °C de saklandı.

### **3.2.3 Antioksidan kapasitenin belirlenmesi**

#### **3.2.3.1 DPPH radikal süpürücü aktivite tayini**

Özütlerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi. Brand-Williams vd (1995), tarafından önerilen yöntem deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. (Brand-Williams vd., 1995). Deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1 mg/mL) 500 µL örnek pipetlendi. Deney tüplerinin üzerine 1mM DPPH çözeltisinden 2,5 mL pipetlenerek oda sıcaklığında ışık geçirmeyen bir yerde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 517 nm’deki absorbansı etanolden oluşan köre karşı kaydedilmiştir. Azalan absorbans geriye kalan DPPH çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermiştir. Yüzde DPPH radikal süpürücü aktivite aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\text{Radikal süpürme gücü (\%)} = [(A_0 - A_1 / A_0)] * 100$$

A<sub>0</sub>: DPPH çözeltisinin absorbansı

A<sub>1</sub>: DPPH çözeltisi içinde test edilen örneklerin absorbansı

#### **3.2.3.2 CUPRAC metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini**

Bakır (II) indirgeme gücü ölçümü Apak, (2004)’e göre deney şartlarının gerektirdiği bazı modifikasyonlar gerçekleştirilerek uygulandı (Apak vd., 2004). Deney tüplerine 1 mL



Bakır (II) klorür çözeltisi konuldu. Her bir tüpe 1 mL neokuproin çözeltisi ilave edildi. Her tüpe 1 mL 0,2 M potasyum fosfat tamponu eklendi (pH=7). Tüpler karıştırıldıktan sonra her bir tüpe farklı derişimlerde (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1 mg/mL) 500 µL örnek konuldu. Kontrol için örnek yerine askorbik asit eklendi. Kör tüp için örnek yerine distile su eklendi. Örnekler 50 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örneklerin 450 nm'deki absorbansı kör numuneye karşı okundu.

### 3.2.3.3 İndirgeme gücü tayini

İndirgeme gücü ölçümü Oyaizu, (1986)'a göre gerekli modifikasyonlar yapılarak uygulandı (Oyaizu, 1986). Deney tüplerine farklı derişimlerde (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1 mg/mL) 500 µL örnek konuldu. Kontrol tüpünde örnek yerine etanol kullanıldı. Her tüpe 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL % 1'lik potasyum ferri siyanür ilave edilerek karışım su banyosunda 50 °C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Su banyosunun ardından tüplerin üzerine 2,5 mL % 10'luk trikloro asetik asit çözeltisi eklendi ve tüpler iyice çalkalandı. Deney tüpleri 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu serumdan 2,5 mL alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve 0,1 mL % 0,1'lik FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisi eklendi. Mavi renk alan çözeltinin 700nm'deki absorbansı distile suya karşı okundu.

### 3.2.3.4 β-Karoten bleaching metodu tayini

Beta karoten bleaching metodu He vd (2012)'e göre gerekli modifikasyonlar yapılarak uygulandı (He vd., 2012). Deney tüplerine farklı derişimlerde (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1 mg/mL) 500 µL örnek konuldu. Kontrol tüpü için örnek yerine etanol kullanıldı. Her bir tüpe 4,5 mL β-karoten emülsiyonu eklenip tüpler çalkalandı. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 0,5 mL etanol konuldu. Emülsiyon test tüplerine ilave edilmesinin hemen ardından spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Tüpler 50 °C'de inkübasyona bırakıldı. β-karotenin rengi kayboluncaya kadar her yarım saatte bir tekrar okuma yapıldı. (120 dakika). Antioksidan aktivite ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Antioksidan aktivite} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}})] * 100$$

## BÖLÜM IV

### BULGULAR

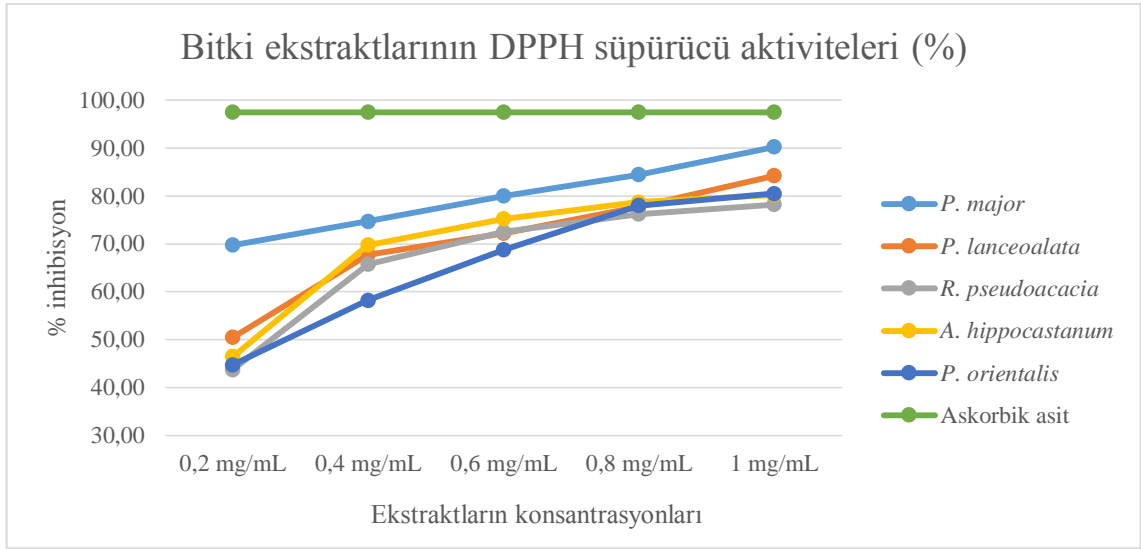
#### 4.1 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Bulguları

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik kararlı bir bileşiktir. Doğal bileşiklerin serbest radikal giderici aktivitelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. DPPH radikalının 517 nm dalga boyundaki absorbansının azalması test edilen örneğin antiradikal aktivitesini göstermektedir (Brand-Williams vd., 1995). Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyondaki (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL ve 1 mg/mL ) çözeltilerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri çizelge 4.1., şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

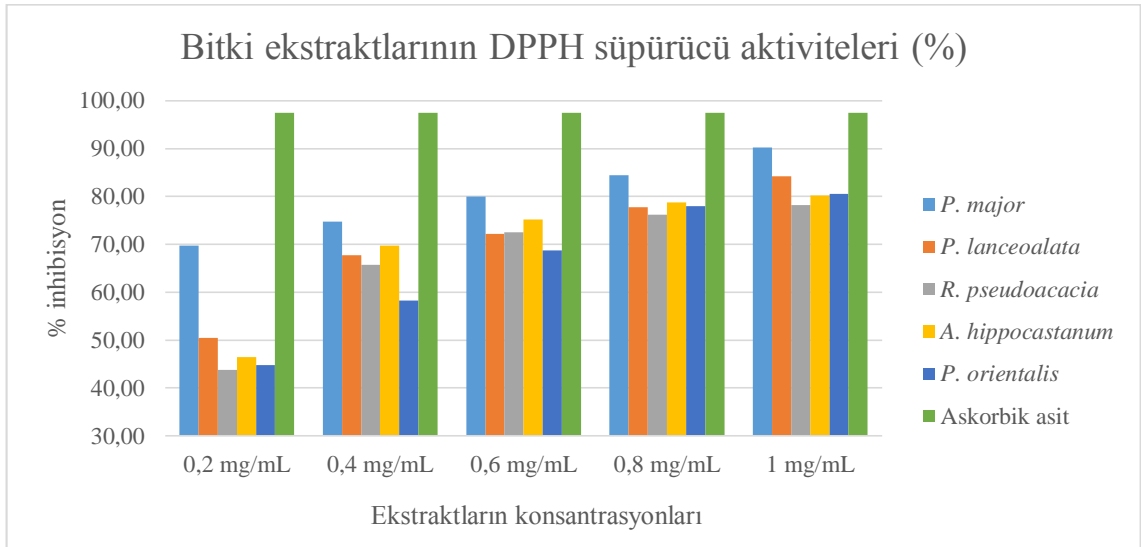
**Çizelge 4.1.** Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,25-1 mg/mL) bitki etanolik ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri (%)

Konsantrasyon	Bitki ekstraktlarının DPPH süpürücü aktiviteleri (%)				
	0,2 mg/mL	0,4 mg/mL	0,6 mg/mL	0,8mg/mL	1 mg/mL
<i>P. major</i>	69,75	74,75	80	84,5	90,25
<i>P. lanceolata</i>	50,5	67,75	72,25	77,75	84,25
<i>R. pseudoacacia</i>	43,75	65,75	72,5	76,25	78,25
<i>A. hippocastanum</i>	46,5	69,75	75,25	78,75	80,25
<i>P. orientalis</i>	44,75	58,25	68,75	78	80,5
Askorbik asit	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5





Şekil 4.1. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu



Şekil 4.2. Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu

Şekil 4.1. ve şekil 4.2. incelendiğinde bitki ekstraktları içinde en yüksek antioksidan aktiviteyi *Plantago major* en düşük aktiviteyi ise *Robinia pseudoacacia* göstermiştir.

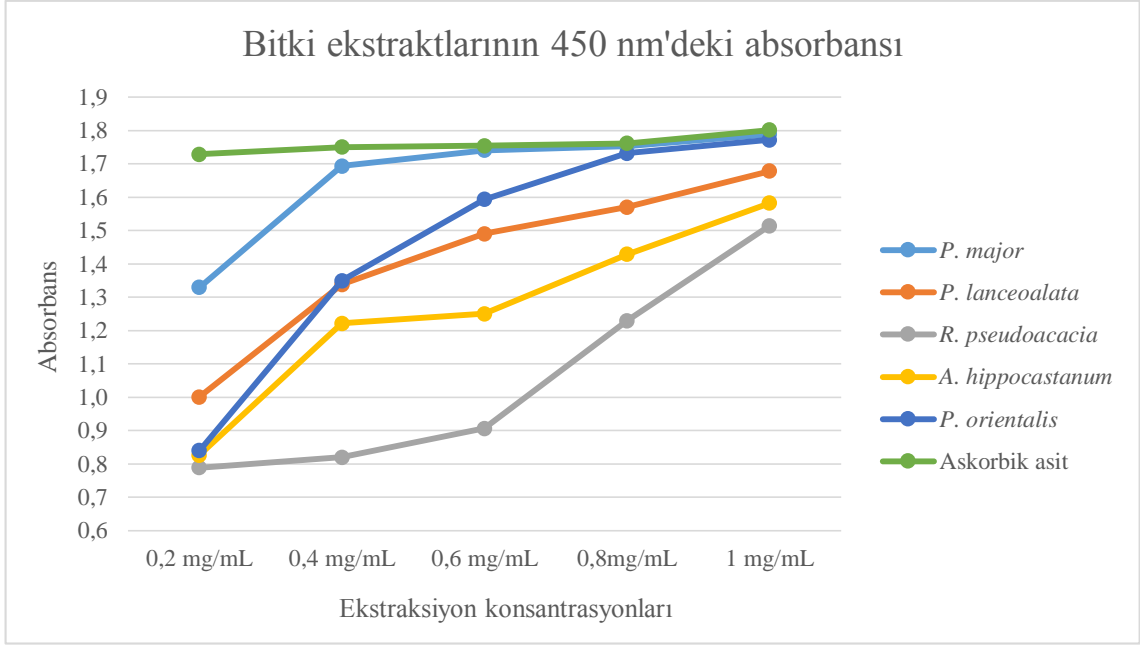
#### 4.2 CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Bulguları

Bitki örneklerinden elde edilen etanol ekstraktlarının kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi ekstraktların artan kapasiteleri ile doğru orantılıdır. Farklı konsantrasyonlardaki (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL ve 1 mg/mL ) bitki ekstraktlarının kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi, çözeltilerin 450 nm'deki absorbanslarının ölçülmesi sonucu elde edilmiştir. Bitki ekstraktlarının farklı

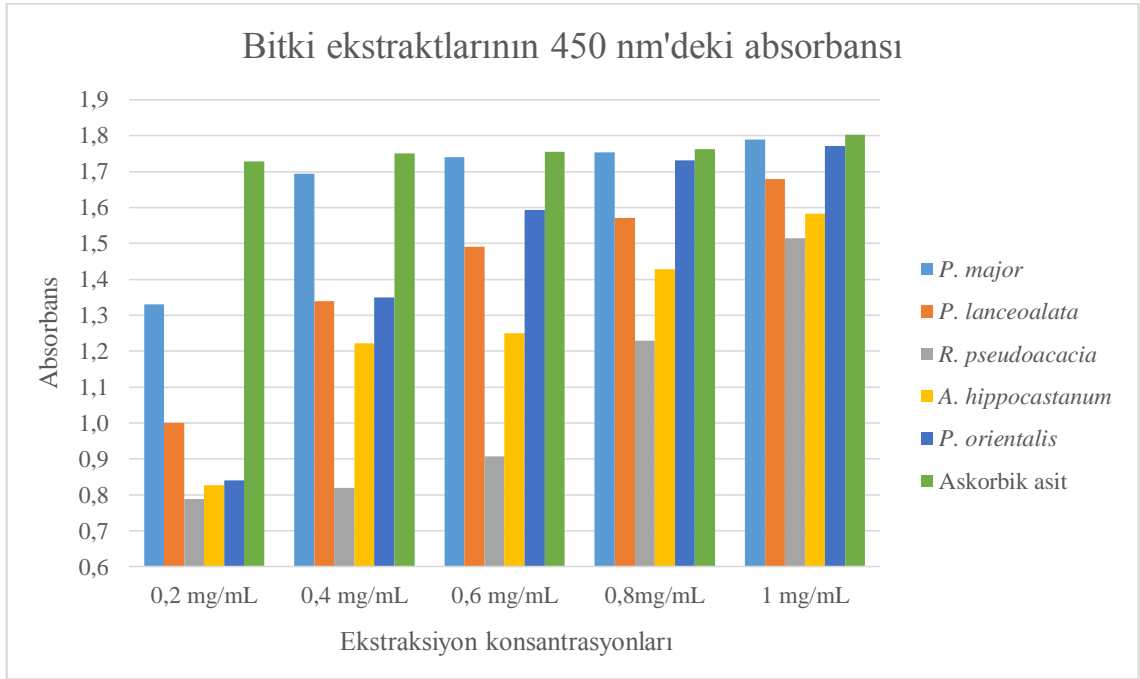
konsantrasyondaki (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL ve 1 mg/mL ) çözeltilerinin 450 nm dalga boyundaki absorbansları çizelge 4.2., şekil 4.3. ve şekil 4.4.'de gösterilmektedir. Şekil 4.3., şekil 4.4. ve çizelge 4.2. incelendiğinde kuprik iyonlarını (Cu<sup>2+</sup>) en yüksek düzeyde indirgeme kapasitesi *Plantago major*'da gözlenmiştir. En düşük kapasite ise *Robinia pseudoacacia*'da tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

**Çizelge 4.2.** Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,20-1 mg/mL) bitki etanol ekstraktlarının 450 nm'deki absorbansı

Konsantrasyon	Bitki ekstraktlarının 450 nm'deki absorbansı				
	0,2 mg/mL	0,4 mg/mL	0,6 mg/mL	0,8mg/mL	1 mg/mL
<i>P. major</i>	1,330	1,694	1,741	1,753	1,789
<i>P. lanceolata</i>	1,001	1,339	1,491	1,571	1,679
<i>R. pseudoacacia</i>	0,789	0,820	0,907	1,230	1,515
<i>A. hippocastanum</i>	0,827	1,222	1,251	1,429	1,583
<i>P. orientalis</i>	0,840	1,350	1,594	1,732	1,772
Askorbik asit	1,729	1,751	1,755	1,762	1,802



**Şekil 4.3.** Bitki ekstraktlarının 450 nm'deki absorbansı



**Şekil 4.4.** Bitki ekstraktlarının 450 nm'deki absorbansı

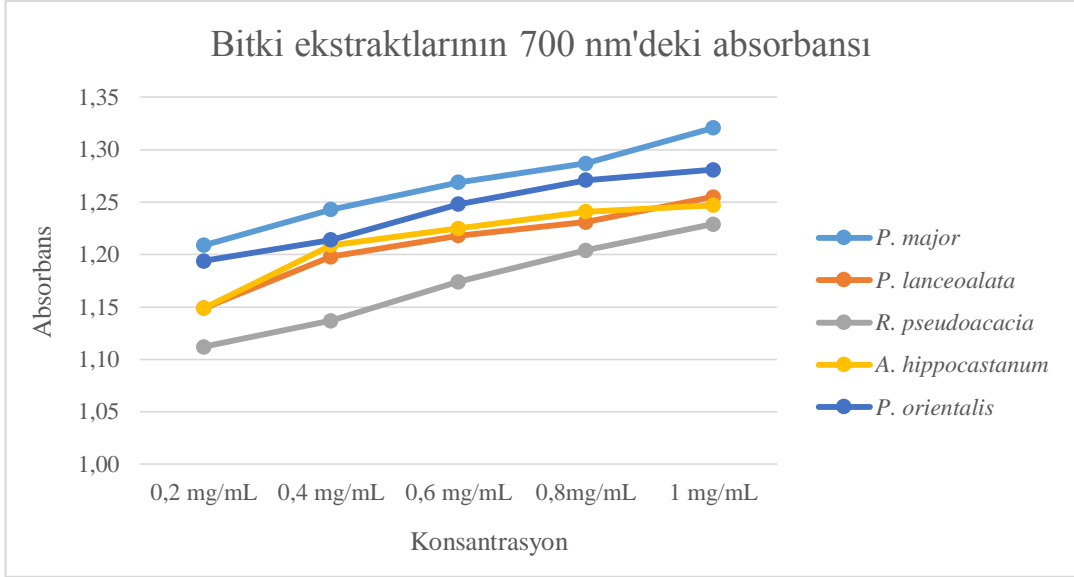
### 4.3 İndirgeme Gücü Bulguları

İndirgeme gücü belirlenmesi metodunda yüksek absorbans değeri yüksek indirgenme gücünün göstergesi olarak kabul edilmektedir (Bursal ve Köksal, 2011). Bu çalışmada kullanılan bitkilerden elde edilen ekstraktların indirgeme gücü, konsantrasyonlarının artmasıyla doğru orantılı olarak artmıştır. Bitki ekstraktlarının indirgeme gücü, farklı

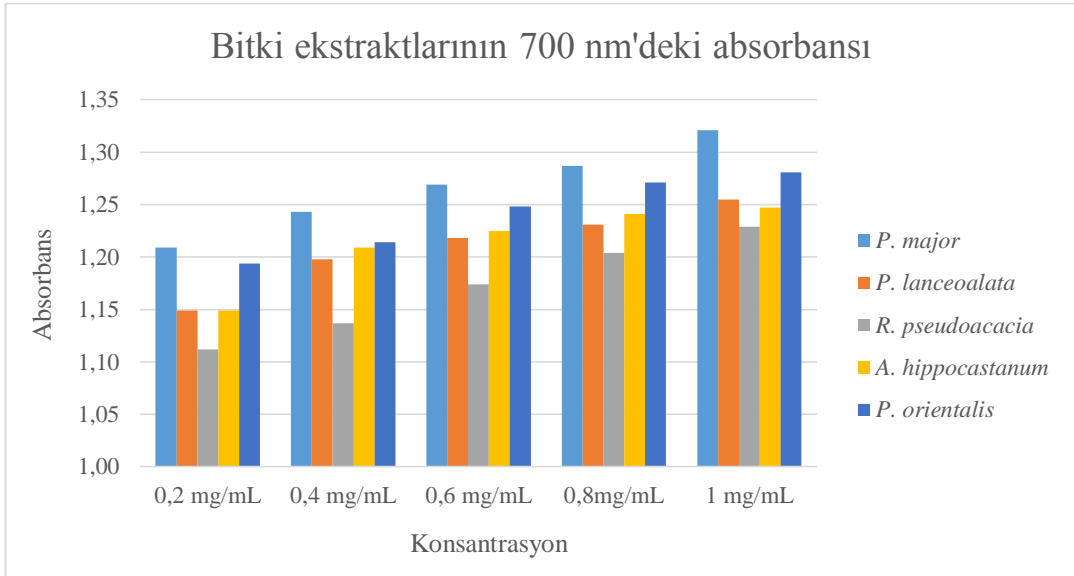
konsantrasyonlardaki çözeltilerin 700 nm'deki absorbanları ölçülerek belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyondaki (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL ve 1 mg/mL ) çözeltilerinin, 700 nm dalga boyundaki absorbanları çizelge 4.3., şekil 4.5. ve şekil 4.6.'da gösterilmektedir. Çizelge 4.3., şekil 4.5. ve şekil 4.6. incelendiğinde *Plantago major* ekstraktının en yüksek indirgeme gücü özelliği gösterdiği gözlenmektedir. En düşük indirgeme gücü özelliğini ise *Robinia pseudoacacia* göstermektedir. (Şekil 4.6.)

**Çizelge 4.3.** Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,20-1 mg/mL) bitki etanol ekstraktlarının 700 nm'deki absorbanı

Konsantrasyon	Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbanı				
	0,2 mg/mL	0,4 mg/mL	0,6 mg/mL	0,8mg/mL	1 mg/mL
<i>P. major</i>	1,209	1,243	1,269	1,287	1,321
<i>P. lanceolata</i>	1,149	1,198	1,218	1,231	1,255
<i>R. pseudoacacia</i>	1,112	1,600	1,174	1,204	1,229
<i>A. hippocastanum</i>	1,149	1,209	1,225	1,241	1,247
<i>P. orientalis</i>	1,194	1,214	1,248	1,271	1,281
Kontrol	1,145				



**Şekil 4.5.** Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbansı



**Şekil 4.6.** Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbansı

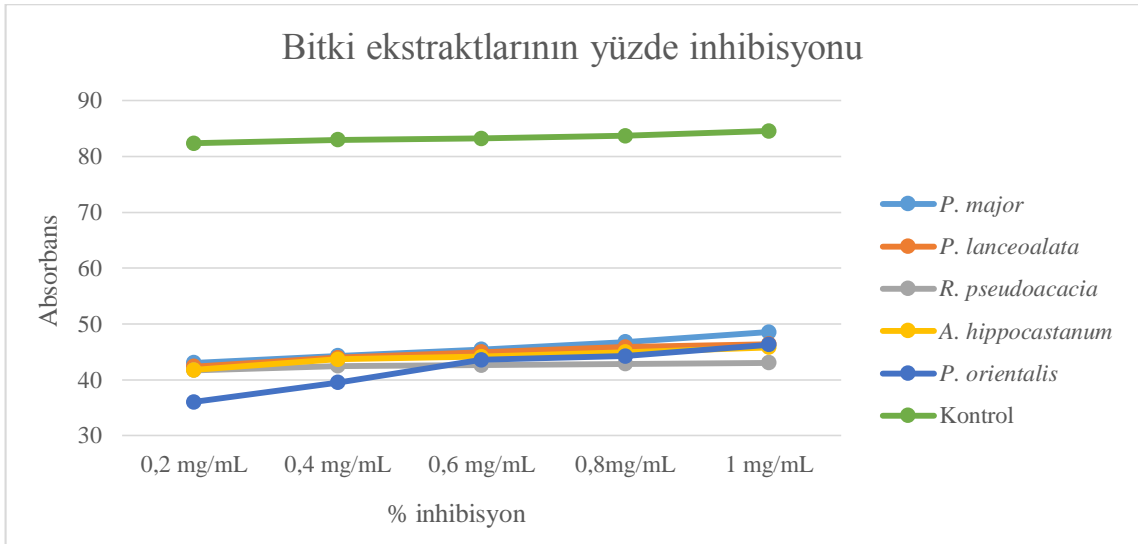
#### 4.4 $\beta$ -Karoten Bleaching Metodu Bulguları

Beta karoten bleaching metodunda yüksek absorbans değeri yüksek antioksidan kapasitenin göstergesidir. Bu çalışmada bitki ekstraktlarının beta karoten beyazlatma sonuçları farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin 490 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL ve 1 mg/mL ) çözeltilerinin, 490 nm dalga boyundaki ilk absorbansları çizelge 4.4. ve şekil 4.7.'de gösterilmektedir. Bitki ekstraktlarının son

absorbansları çizelge 4.5. ve şekil 4.8.'de gösterilmektedir. Çizelge 4.5. ve şekil 4.8. incelendiğinde en yüksek beta karoten bleaching özelliği *Plantago major*'da saptanmıştır. En düşük kapasite ise *Robinia pseudoacacia*'da elde edilmiştir. (Şekil 4.9.)

**Çizelge 4.4.** Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (0,20-1 mg/mL) elde edilen etanol ekstraktlarının 490 nm'deki ilk absorbansının % inhibisyonu

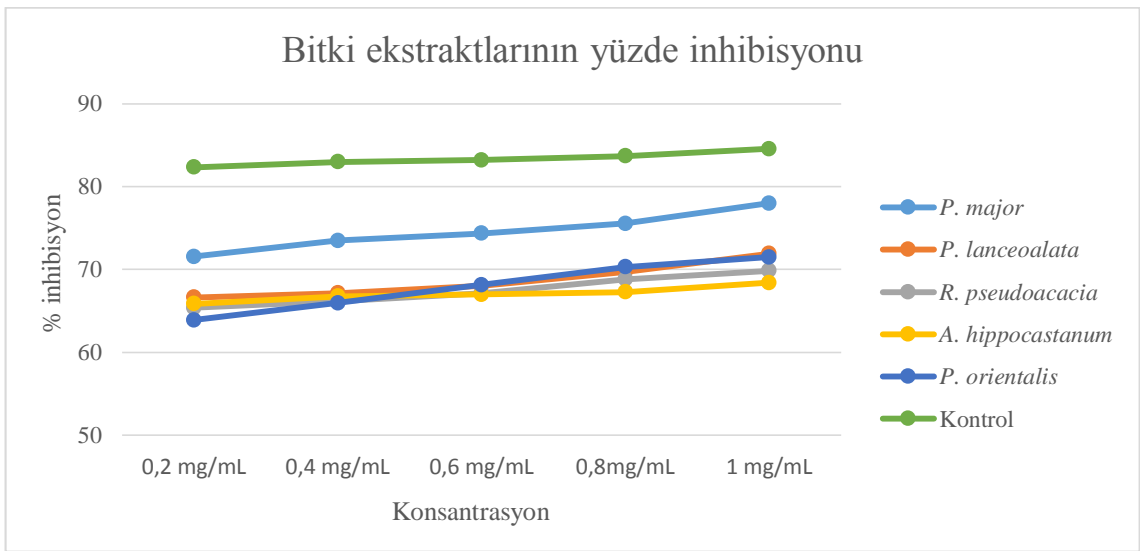
Konsantrasyon	Bitki ekstraktlarının 490 nm'deki absorbansı				
	0,2 mg/mL	0,4 mg/mL	0,6 mg/mL	0,8mg/mL	1 mg/mL
<i>P. major</i>	42,37	43,97	44,94	45,85	46,37
<i>P. lanceolata</i>	43,04	44,31	45,45	46,77	48,54
<i>R. pseudoacacia</i>	41,69	42,49	42,6	42,88	43,04
<i>A. hippocastanum</i>	41,74	43,68	44,14	44,98	45,8
<i>P. orientalis</i>	36,03	39,52	43,57	44,26	46,31



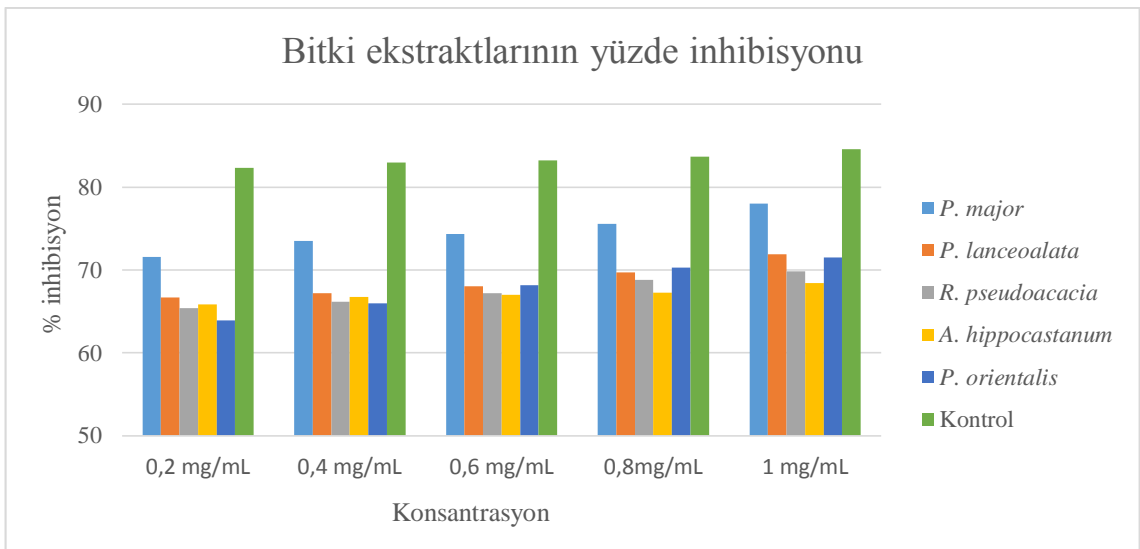
**Şekil 4.7.** Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu

**Çizelge 4.5.** Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (0,20-1 mg/mL) elde edilen etanol ekstraktlarının 490 nm'deki son absorbansının % inhibisyonu

Konsantrasyon	Bitki ekstraktlarının 490 nm'deki absorbansı				
	0,2 mg/mL	0,4 mg/mL	0,6 mg/mL	0,8mg/mL	1 mg/mL
<i>P. major</i>	71,56	73,5	74,35	75,54	78,01
<i>P. lanceoalata</i>	66,65	67,16	68,02	69,73	71,90
<i>R. pseudoacacia</i>	65,39	66,19	67,16	68,82	69,85
<i>A. hippocastanum</i>	65,85	66,76	66,99	67,28	68,42
<i>P. orientalis</i>	63,91	65,96	68,13	70,30	71,50



**Şekil 4.8.** Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu



**Şekil 4.9.** Bitki ekstraktlarının % inhibisyonu

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA

Bu çalışmada, farklı düzeylerde allantoin içeren *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum* türlerinin etanol özütlerinin radikal süpürme gücü, indirgeme gücü ölçümü, bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) ve  $\beta$ -Karoten bleaching metodları ile *in vitro* olarak antioksidan kapasiteleri incelenerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Literatür taramasında, allantoin içeren bitkilerin antioksidan özelliklerinin test edilmesine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

DPPH radikali çok reaktif sentetik radikal olmasına rağmen, antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılan kabul görmüş bir intikatördür (Brand-Williams vd., 1995, Sharma ve Bhat, 2009). DPPH çözeltisi mor renklidir ve antioksidan bir maddeyle etkileştiğinde sarıya dönüşen bir renk alır. DPPH'in bu renk değişimi spektrofotometre ile 517 nm'de ölçülür. Çalışmamızda, etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının 0,2-1 mg/mL arası konsantrasyonlara sahip çözeltilerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılmıştır. Çizelge 5.1 ve tablo 5.1 incelendiğinde bütün etanol ekstraktları DPPH radikal süpürücü aktivite göstermiştir. DPPH radikal süpürücü aktivitenin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. Bitki ekstraktları arasında en yüksek DPPH radikal süpürücü aktiviteyi *Plantago major* göstermiştir. En düşük DPPH radikal süpürücü aktiviteyi *Robinia pseudoacacia* göstermiştir. Bitki örneklerinin etanol ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri sıralaması ise şöyledir; *Plantago major* > *Plantago lanceolata* > *Platanus orientalis* > *Aesculus hippocastanum* > *Robinia pseudoacacia*. Stanisavljević vd (2008) yaptığı bir çalışmada *Plantago major* yapraklarının etanol ekstraktlarının antioksidan aktivite gösterdiğini rapor etmiştir (Stanisavljević vd., 2008). Kartini vd (2014), *Plantago major*'un metanollü ekstraktları ile yaptığı bir çalışmada DPPH radikal süpürücü aktivite testleri sonucu antioksidan etki gösterdiği bulgusunu elde etmiştir (Kartini vd., 2014). Dalar vd (2012) tarafından yapılan *Plantago lanceolata*'nın metanollü ekstraktlarının yüksek antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Dalar vd., 2012). Wilkinson ve Brown (1999) tarafından yapılan *in vitro* çalışmada *Aesculus hippocastanum*'un hidroksil radikallerini ve süperoksit anyonlarını temizleyen antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir



(Wilkinson ve Brown, 1999). Literatürde, *Robinia pseudoacacia* ve *Platanus orientalis*'in antioksidan özelliği ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Şekil 5.1 ve tablo 5.1 incelendiğinde çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, spektrofotometrik yöntemlerle antioksidan kapasitenin tayin edilmesinde kullanılan metodlardan biri olan 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite' kısaca CUPRAC olarak adlandırılan metod kullanıldı. Bu metod 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgeme yeteneğinden yararlanarak antioksidan aktivitenin ölçülmesine imkan verir (Apak vd., 2004). Absorbansdaki artış kompleksin oluşturduğu indirgeme özelliğini gösterir. Çalışmamızda, etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının 0,2-1 mg/mL arası konsantrasyonlara sahip çözeltilerinin CUPRAC metodu ile antioksidan etkileri araştırılmıştır. Şekil 5.2 ve tablo 5.2 incelendiğinde bütün etanol ekstraktlarında antioksidan aktivite gözlenmiştir. En yüksek antioksidan aktiviteyi *Plantago major* göstermiştir. En düşük aktiviteyi ise *Robinia pseudoacacia* göstermiştir. CUPRAC metoduna göre 0,2-1 mg/mL arası konsantrasyonlara sahip etanol ekstraktlarının sıralaması *Plantago major* > *Platanus orientalis* > *Plantago lanceolata* > *Aesculus hippocastanum* > *Robinia pseudoacacia*. Heo vd (2013), *Polygonum tinctorium* bitkisinin tohum ve yapraklarının metanollü ekstrasyonlarıyla yaptıkları çalışmada CUPRAC yöntemini kullanarak metanollü ekstraktların antioksidan aktivite gösterdiğini belirlemiştir (Heo vd., 2013). Azzouzi vd (2014)'te *Bituminaria bituminosa*'nın metanollü ekstraktlarında yaptıkları *in vitro* çalışmada CUPRAC yöntemi ile yüksek oranda antioksidan aktiviteyi tespit etmiştir (Azzouzi vd., 2014). Kamiloğlu vd (2014), siyah havuç ile yapılan reçel ve marmelatlarda CUPRAC metodunu kullanarak antioksidan aktivite belirlendiğini göstermiştir (Kamiloğlu vd., 2014). Cansev vd (2012), çilek bitkisinin sıcaklığa bağlı fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi hakkında yaptığı çalışmada CUPRAC metodu ile antioksidan özelliği belirlemiştir (Cansev vd., 2012). Yapılan literatür taramasında bu tez çalışmasında kullanılan bitki örneklerinin 0,2-1 mg/mL arası farklı konsantrasyonlarda olan etanol ekstraktlarıyla ilgili herhangi bir çalışmada CUPRAC metodunun kullanıldığına rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemlerden biri de Ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (FRAP) metodudur. FRAP metodu, antioksidan içeren bir örneğin  $Fe^{3+}$ 'ün  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesi ve fazla  $Fe^{3+}$ 'ün ortamda oluşturduğu  $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$  kompleksinin 700 nm dalga boyundaki absorbanslarının ölçülmesine dayanmaktadır. Absorbansdaki artış kompleksin ortamda miktarının artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermiştir (Bolanos de la Torre vd., 2015). Çalışmamızda, etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının 0,2-1 mg/mL arası konsantrasyonlara sahip çözeltilerinin FRAP metodu ile antioksidan etkileri araştırılmıştır. Şekil 5.3 ve tablo 5.3 incelendiğinde bütün etanol ekstraktlarında  $Fe^{3+}$ 'ün  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesi gözlenmiştir. Bitki örneklerinin etanol ekstraktlarında arasında en yüksek  $Fe^{3+}$ 'ü  $Fe^{2+}$ 'ye indirge özelliği *Plantago major*'da gözlenmiştir. En düşük aktivite ise *Robinia pseudoacacia*'da gözlenmiştir. Bitki örneklerinin etanol ekstraktlarının gösterdiği antioksidan aktiviteye göre sıralaması şu şekildedir: *Plantago major* > *Platanus orientalis* > *Plantago lanceolata* > *Aesculus hippocastanum* > *Robinia pseudoacacia*. Gonçalves vd (2014) *Plantago* türlerinin etanol ekstraktlarıyla ilgili yaptığı çalışmada *plantago* türlerinin yüksek antioksidan özellik gösterdiğini belirtmiştir (Gonçalves vd., 2015). Dalar vd (2012) *Plantago lanceolata*'nın etanol özütü ile yaptıkları çalışmada yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (Dalar vd., 2012). Aynı zamanda Berava vd (2012)'de yaptığı bir çalışmada aynı sonuçları aldığını belirtmiştir (Beara vd., 2012). McCune (2013)'de yaptığı çalışma *Aesculus hippocastanum*'un antioksidan özelliğine sahip olduğundan bahsedilmiştir (McCune, 2013). Küçükkurt vd (2010)'da *Aesculus hippocastanum*'un tohumları üzerine yaptığı *in vivo* çalışmada *Aesculus hippocastanum*'un antioksidan özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Kucukurt vd., 2010). *Platanus orientalis* geleneksel tıpta astıma karşı kullanılmıştır (Asadbeigi vd., 2014). Fakat literatürde antioksidan özelliklerine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatür taramasında *Robinia pseudoacacia* ile ilgili bir antioksidan aktivite çalışmasına rastlanmamıştır.

Beta karoten bleaching metodu beta karotenin renginin ağarmasına dayanan bir metoddur. Bu metodda antioksidan kapasite kullanılan etanol ekstraktlarının zamanla beta karotenin rengini ağartmasını, 490 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Çalışmamızda, etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının 0,2-1 mg/mL arası konsantrasyonlara sahip çözeltilerinin beta karoten bleaching metodu kullanılarak antioksidan etkileri araştırılmıştır. Abdel-Mageed vd (2014) *Simmondsia chinensis*

bitkisinin yapraklarının etanol ekstraktları ile ilgili yaptıkları *in vitro* çalışmada beta karoten bleaching metodu kullanmışlardır. Sonuçlar değerlendirildiğinde *Simmondsia chinensis* bitkisinin yapraklarının etanol ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktiviteden daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Abdel-Mageed vd., 2014). Bor vd (2012) *Crataegus orientalis* yapraklarının etanol ile ekstraktlarıyla yaptığı çalışmada beta karoten bleaching metodunu kullanmış ve pozitif sonuçlar elde etmiştir (Bor vd., 2012). Seow vd (2014) *Gynura segetum* yapraklarının metanol ekstraktları ile yaptığı çalışmada beta karoten bleaching yöntemini test etmiştir ve pozitif sonuçlar almıştır (Seow vd., 2014). Çalışmamızda kullanılan *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum* bitki örneklerinin etanol ekstraktlarının beta karoten bleaching metodu kullanılarak yapılan herhangi bir antioksidan çalışmasına literatürde rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında bütün bitki örneklerinin etanol ekstraktlarında beta karoten bleaching metoduyla antioksidan aktivite belirlenmiştir.

Türkiye bitki türü açısından, dünyanın en zengin ülkeleri arasındadır. Türkiye'nin coğrafi sınırları içerisinde geniş yayılım gösteren pek çok bitki türü bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında Türkiye sınırları içerisinde geniş yayılım gösteren ve allantoin içeriği açısından zengin olan bazı bitki türlerini belirleyip bunların *in vitro* antioksidan aktivitelerini daha düşük allantoin içeriğine sahip bitki türleri ile karşılaştırdık. Seçtiğimiz *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Robinia pseudoacacia*, *Platanus orientalis* ve *Aesculus hippocastanum* bitki örneklerinin etanol ekstraktlarında radikal süpürme gücü, indirgeme gücü ölçümü, bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve  $\beta$ -karoten bleaching metodlarını kullanarak *in vitro* analizler yapıldı. Bu analizler sonucunda allantoin seviyesi en yüksek olan *Plantago major*'un en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği bilgisi elde edildi. Sonuç olarak, *Plantago major*'un allantoin içeriğiyle bağlı olarak diğer bitki örneklerine göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermesinin allantoin içeriği ile ilgili olabileceği düşüncesine ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

Abdel-Mageed, W. M., Bayoumi, S. A. L. H., Salama, A. A. R., Salem-Bekhit, M. M., Abd-Alrahman, S. H. and Sayed, H. M., "Antioxidant lipoxygenase inhibitors from the leaf extracts of *Simmondsia chinensis*", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, 521-526, 2014.

Adams, M., Berset, C., Kessler, M. and Hamburger, M., "Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders--a survey of European herbals from the 16th and 17th century", *Journal of Ethnopharmacology* 121(3), 343-359, 2009.

Aguilera, Y., Herrera, T., Benitez, V., Arribas, S. M., Lopez de Pablo, A. L., Esteban, R. M. and Martin-Cabrejas, M. A., "Estimation of scavenging capacity of melatonin and other antioxidants: Contribution and evaluation in germinated seeds", *Food Chemistry* 170, 203-211, 2015.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Karademir, S. E., "Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26), 7970-7981, 2004.

Asadbeigi, M., Mohammadi, T., Rafieian-Kopaei, M., Saki, K., Bahmani, M. and Delfan, M., "Traditional effects of medicinal plants in the treatment of respiratory diseases and disorders: an ethnobotanical study in the Urmia", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, 364-368, 2014.

Azzouzi, S., Zaabat, N., Medjroubi, K., Akkal, S., Benlabed, K., Smati, F. and Dijoux-Franca, M.-G., "Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae)", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, S481-S484, 2014.

Bakker, M. I., Baas, W. J., Sijm, D. T. H. M. and Kollöffel, C., "Leaf wax of *Lactuca sativa* and *Plantago major*", *Phytochemistry* 47(8), 1489-1493, 1998.

Baydar, N. G. and Baydar, H., "Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts", *Industrial Crops and Products* 41(0), 375-380, 2013.

Bazil, J. N., Pannala, V. R., Dash, R. K. and Beard, D. A., "Determining the origins of superoxide and hydrogen peroxide in the mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase", *Free Radical Biology and Medicine*, 2014.

Beara, I. N., Lešnjak, M. M., Orčić, D. Z., Simin, N. Đ., Četojević-Simin, D. D., Božin, B. N. and Mimica-Dukić, N. M., "Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L", *LWT - Food Science and Technology* 47(1), 64-70, 2012.

Bolanos de la Torre, A. A., Henderson, T., Nigam, P. S. and Owusu-Apenten, R. K., "A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey", *Food Chemistry* 174, 119-123, 2015.

Bor, Z., Arslan, R., Bektaş, N., Pırıldar, S. and Dönmez, A. A., "Antinociceptive, antiinflammatory and antioxidant activities of the ethanol extract of *Crataegus orientalis* leaves", *Turkish Journal of Medical Sciences* 42(2), 315-324, 2012.

Braga, R. R., Sales, J., Marins Rde, C., Ortiz, G. M. and Garcia, S., "Development and validation of a method for allantoin determination in liposomes and pharmaceutical formulations", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 91, 389-394, 2012.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology* 28(1), 25-30, 1995.

Bruno, R. S. and Mah, E., Reference Module in Biomedical Sciences (Vitamin E), *Elsevier*, 2014.

- Bursal, E. and Köksal, E., "Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.)", *Food Research International* 44(7), 2217-2221, 2011.
- Burton, G. J. and Jauniaux, E., "Oxidative stress", *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25(3), 287-299, 2011.
- Cansev, A., Kesici, M., Ergin, S. and Gülen, H., "Effects of high temperature stress on total phenolic content and antioxidant capacity in strawberry plants", *New Biotechnology* 29, S120, 2012.
- Carocho, M. and Ferreira, I. C., "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives", *Food and Chemical Toxicology* 51, 15-25, 2013.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F. and Loggia, R. D., "In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants", *Journal of Ethnopharmacology* 116(1), 144-151, 2008.
- Dalar, A., Türker, M. and Konczak, I., "Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey", *Journal of Herbal Medicine* 2(2), 42-51, 2012.
- Dasgupta, A. and Klein, K., *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements* (Chapter 15 - Antioxidant Vitamins and Minerals), *Elsevier*, San Diego, 2014.
- Davis, P. H., *Flora of Turkey and the East Aegean islands*, *Edinburgh at the University Press*, Edinburg, UK, 1982.
- Dröge, W., "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function", *Physiological Reviews* 82(1), 47-95, 2002.

Elangovan, V., Sekar, N. and Govindasamy, S., "Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis", *Cancer Letters* 87(1), 107-113, 1994.

Falowo, A. B., Fayemi, P. O. and Muchenje, V., "Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review", *Food Research International* 64(0), 171-181, 2014.

Farrugia, G. and Balzan, R., "Oxidative stress and programmed cell death in yeast", *Frontiers in Oncology* 2, 2012.

Formica, J. V. and Regelson, W., "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids", *Food and Chemical Toxicology* 33(12), 1061-1080, 1995.

French, J. B., Neau, D. B. and Ealick, S. E., "Characterization of the structure and function of *Klebsiella pneumoniae* allantoin racemase", *Journal of Molecular Biology* 410(3), 447-460, 2011.

Fu, Y.-C., Ferng, L.-H. A. and Huang, P.-Y., "Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bulbil of the *Dioscorea* species", *Food Chemistry* 94(4), 541-549, 2006.

Garg, D., Shaikh, A., Muley, A. and Marar, T., "In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves", *Free Radicals and Antioxidants* 2(3), 41-46, 2012.

Gonçalves, S., Grevenstuk, T., Martins, N. and Romano, A., "Antioxidant activity and verbascoside content in extracts from two uninvestigated endemic *Plantago* spp", *Industrial Crops and Products* 65, 198-202, 2015.

Gruhlke, M. C. and Slusarenko, A. J., "The biology of reactive sulfur species (RSS)", *Plant Physiology and Biochemistry* 59, 98-107, 2012.

Haider, S., Nazreen, S., Alam, M. M., Hamid, H. and Alam, M. S., "Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Platanus orientalis* Linn. and its ulcerogenic risk evaluation", *Journal of Ethnopharmacology* 143(1), 236-240, 2012.

Halliwell, B. and Gutteridge, M. C. J., "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease", *Biochemical Journal* 219, 1 - 19, 1984.

He, J., Huang, B., Ban, X., Tian, J., Zhu, L. and Wang, Y., "In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*", *Journal of Ethnopharmacology* 141(1), 104-110, 2012.

Heo, B.-G., Jang, H.-G., Cho, J. Y., Namiesnik, J., Jastrzebski, Z., Vearasilp, K., González-Aguilar, G., Martínez-Ayala, A. L., Suhaj, M. and Gorinstein, S., "Partial characterization of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) plant seeds and leaves", *Industrial Crops and Products* 42, 429-439, 2013.

Hongyan, L., Tu, H., Wang, Y. and Levine, M., "Vitamin C in mouse and human red blood cells: An HPLC assay", *Analytical Biochemistry* 426(2), 109-117, 2012.

Huque, R., Wills, R. B. H., Pristijono, P. and Golding, J. B., "Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning", *Postharvest Biology and Technology* 78(0), 16-23, 2013.

Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Camp, J. V. and Capanoglu, E., "Influence of different processing and storage conditions on in vitro bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades", *Food Chemistry*, 2014.

Kand'ar, R., Zakova, P. and Muzakova, V., "Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography", *Clinica Chimica Acta* 365(1-2), 249-256, 2006.



Kartini, Piyaviriyakul, S., Siripong, P. and Vallisuta, O., "HPTLC simultaneous quantification of triterpene acids for quality control of *Plantago major* L. and evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities", *Industrial Crops and Products* 60, 239-246, 2014.

Khan, M. K., Zill, E. H. and Dangles, O., "A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols", *Journal of Food Composition and Analysis* 33(1), 85-104, 2014.

Kim, Kim, M. I., Chung, J., Ahn, J. H. and Rhee, S., "Crystal structure of metal-dependent allantoinase from *Escherichia coli*", *Journal of Molecular Biology* 387(5), 1067-1074, 2009.

Kim, Y. J., Shibata, K., Uyama, H. and Kobayashi, S., "Synthesis of ultrahigh molecular weight phenolic polymers by enzymatic polymerization in the presence of amphiphilic triblock copolymer in water", *Polymer* 49(22), 4791-4795, 2008.

Kimura, H., Ogura, T., Kurashima, Y., Weisz, A. and Esumi, H., "Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296(4), 976-982, 2002.

Kljak, K. and Grbeša, D., "Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids", *Food Chemistry* 167(0), 402-408, 2015.

Koheil, M. A., Hussein, M. A., Othman, S. M. and El-Haddad, A., "Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Moringa peregrina* Seeds", *Free Radicals and Antioxidants* 1(2), 49-61, 2011.

Kucukkurt, I., Ince, S., Keles, H., Akkol, E. K., Avci, G., Yesilada, E. and Bacak, E., "Beneficial effects of *Aesculus hippocastanum* L. seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration", *Journal of Ethnopharmacology* 129(1), 18-22, 2010.

Kumar, S., "Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System", *Pelagia Research Library* 2(1), 129 - 135, 2011.

Kumar, U., Mishra, M. and Prakash, V., "Assessment of antioxidant enzymes and free radical scavenging activity of selected medicinal plants", *Free Radicals and Antioxidants* 2(3), 58-63, 2012.

Kuş, N., Bayarı, S. H. and Fausto, R., "Thermal decomposition of allantoin as probed by matrix isolation FTIR spectroscopy", *Tetrahedron* 65(47), 9719-9727, 2009.

Kwangsoo, K., Park, J. and Rhee, S., "Structural and functional basis for (S)-allantoin formation in the ureide pathway", *The Journal of Biological Chemistry* 282(32), 23457–23464, 2007.

Li, H., Horke, S. and Forstermann, U., "Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis", *Atherosclerosis* 237(1), 208-219, 2014.

Madej, E., Folkes, L. K., Wardman, P., Czapski, G. and Goldstein, S., "Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit", *Free Radical Biology and Medicine* 44(12), 2013-2018, 2008.

Mandade, R., Sreenivas, S. A. and Choudhury, A., "Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Carthamus tinctorius Extracts", *Free Radicals and Antioxidants* 1(3), 87-93, 2011.

McCune, L. M., "A Review of the Antioxidant Actions of Three Herbal Medicines (Crataegus monogyna, Ginkgo biloba, and Aesculus hippocastanum) on the Treatment of Cardiovascular Diseases", 243-253, 2013.

Oyaizu, M., "Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine", *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44(6), 307-315, 1986.

Ölçer, A. B. and Gönül, N., "Perkütan absorpsiyon ve perkütan absorpsiyonu etkileyen faktörler", *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara* 31(1), 33-49, 2002.

Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. and Lobo, V., "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", *Pharmacognosy Reviews* 4(8), 118-126, 2010.

Puszyńska-Tuszkana, M., Grabowski, T., Daszkiewicz, M., Wietrzyk, J., Filip, B., Maciejewska, G. and Cieslak-Golonka, M., "Silver(I) complexes with hydantoins and allantoin: synthesis, crystal and molecular structure, cytotoxicity and pharmacokinetics", *Journal of Inorganic Biochemistry* 105(1), 17-22, 2011.

Qaisiya, M., Coda Zabetta, C. D., Bellarosa, C. and Tiribelli, C., "Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway", *Cell Signal* 26(3), 512-520, 2014.

Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., Gopas, J. and Nishigaki, I., "Antioxidants and Human Diseases", *Clin Chim Acta* 436, 332-347, 2014.

Ramkisson, J. S., Mahomoodally, M. F., Ahmed, N. and Subratty, A. H., "Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6(7), 561-569, 2013.

Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N. and Montero, M. P., "Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds", *Food Hydrocolloids* 29(2), 374-381, 2012.

Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R. and Pierce, J. D., "A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses", *Intensive and Critical Care Nursing* 21(1), 24-28, 2005.

Seow, L. J., Beh, H. K., Umar, M. I., Sadikun, A. and Asmawi, M. Z., "Anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Gynura segetum* leaf", *International Immunopharmacology* 23(1), 186-191, 2014.

Sharma, O. P. and Bhat, T. K., "DPPH antioxidant assay revisited", *Food Chemistry* 113(4), 1202-1205, 2009.

Sieracki, N. A., Gantner, B. N., Mao, M., Horner, J. H., Ye, R. D., Malik, A. B., Newcomb, M. E. and Bonini, M. G., "Bioluminescent detection of peroxynitrite with a boronic acid-caged luciferin", *Free Radical Biology and Medicine* 61(0), 40-50, 2013.

Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M., "Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 799(3), 313-317, 1984.

Stanisavljević, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Lazić, M. L. and Veljković, V. B., "Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Extracts from Plantain (*Plantago Major*L.) Leaves", *Separation Science and Technology* 43(14), 3652-3662, 2008.

Tanker, N., Koyunca, M. and Çoşkun, M., *Farmasotik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 2004.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(1), 44-84, 2007.

Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Roman-Ramos, R., Vega-Avila, E. and Perez-Gutierrez, M. S., "Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro", *Journal of Ethnopharmacology* 103(1), 36-42, 2006.

Wilkinson, J. A. and Brown, A. M., "Horse Chestnut - Aesculus Hippocastanum: Potential Applications in Cosmetic Skin-care Products", *International Journal of Cosmetic Science* 21(6), 437-447, 1999.

Zhang, J., Wang, Z.-W. and Mi, Q., "Phenolic compounds from Canna edulis Ker residue and their antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology* 44(10), 2091-2096, 2011.

## ÖZGEÇMİŞ

Cihan Düşgün 1988 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep'de tamamladı. 2008 yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyokimya anabilim dalında tezli yüksek lisansa başladı. 2013 yılında Gaziantep Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü'nde iş sağlığı ve güvenliği tezsiz yüksek lisansına başladı ve aynı yıl tamamladı. Süleyman Demirel Üniversitesi'nde düzenlenen Cell Membranes and Oxidative Stress isimli uluslararası kongreye poster sunumu, Niğde Üniversitesi'nde düzenlenen ulusal tarım kongresine poster sunumu ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'nde düzenlenen 22. Ulusal biyoloji kongresine poster sunumu ile katıldı. Niğde Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları birimindeki hızlı destek (HIDEP) projesinde yardımcı araştırmacı olarak görev aldı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

## TEZ KAPSAMINDA ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet ulusal ve 1 (bir) adet uluslararası bildiri üretilmiştir. Bu üretilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Düşgün, C., Gülhan, M.F., Akgül H. and Selamoğlu, Z., “Allantoin Metabolizmasına Sahip Olan ve Olmayan Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması”, **22. Ulusal Biyoloji Kongresi**, 23-27 Haziran, 2014.

Düşgün, C., Gülhan, M.F., Akgül H. and Selamoğlu, Z., “The study of antioxidant activity by in vitro methods in plants that have different levels of allantoin metabolism”, **Cell Membranes and Oxidative Stress**, 9-12 September, 2014.