

T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Muhammed Nuri BİNGÖL

***Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. BİTKİSİNİN**
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN DEĞİŞİK *in vitro* METOTLAR İLE
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUŞ-2016

T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Muhammed Nuri BİNGÖL

***Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. BİTKİSİNİN**
ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN DEĞİŞİK *in vitro* METOTLAR İLE
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Ercan BURSAL

MUŞ-2016

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Muş Alparslan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “*Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin Değişik *in vitro* Metotlar ile Belirlenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezinin kâğıt ve elektronik kopyalarının Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.
- Tezim/Raporum sadece Muş Alparslan Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.
- Tezimin/Raporumun yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

.../.../2016

Muhammed Nuri BİNGÖL



TEZ KABUL TUTANAĞI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Doç. Dr. Ercan BURSAL danışmanlığında, Muhammed Nuri BİNGÖL tarafından hazırlanan “*Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachyodon* Boiss. bitki türünün antioksidan aktivitesinin değişik *in vitro* metotlar ile belirlenmesi” konulu bu çalışma 23/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ömer KILIÇ

İmza

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI

İmza

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine aittir.

.05. / .09. / 2016

Doç. Dr. Esin KAYA y.
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımnda her türlü konuda destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ercan BURSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma materyalinin temin, tetkik ve teşhisinde bana yardımcı olan Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer KILIÇ'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam süresince bana destek ve katkılarını esirgemeyen Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ALLAHVERDİ, Merkezi Laboratuvar Müdürü Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN ve Fen Bilgisi Öğretmenliği Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI hocalarım ile laboratuvardaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca destek ve katkılarını hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Muhammed Nuri BİNGÖL

HAZİRAN, 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Stachys</i> Bitki Cinsi.....	1
1.1.1. <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachyodon</i> Boiss. bitki türü.....	2
1.2. Serbest Radikaller.....	4
1.2.1. Serbest radikal oluşum kaynakları.....	7
1.2.2. Serbest radikallerin etkileri.....	8
1.2.2.1. Lipitler üzerine etkileri.....	8
1.2.2.2. Proteinler üzerine etkisi.....	8
1.2.2.3. Karbonhidrat yapısına olan etkileri.....	9
1.2.2.4. DNA yapısına olan etkileri.....	9
1.2.3. Serbest radikalleri düzeylerini değiştiren faktörler.....	10
1.3. Antioksidanlar.....	10
1.3.1. Antioksidan savunma sistemi.....	11
1.3.2. Antioksidan molekül türleri.....	14
1.3.2.1. Askorbik asit (C vitamini).....	14
1.3.2.2. Tokoferoller (Vitamin E).....	14
1.3.2.3. β -Karoten (Vitamin A).....	14
1.3.2.4. Melatonin.....	15
1.3.2.5. Folik asit (B ₁₀₋₁₁ Vitamini).....	15
1.3.2.6. Fenolik bileşikler.....	16
2. MATERYAL ve METOT	17
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. Kullanılan bitki materyali.....	17
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	17
2.1.3. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	17
2.2. Metot.....	18
2.2.1. Numunenin su ekstresinin hazırlanması.....	18
2.2.2. Numunenin etanol ekstresinin hazırlanması.....	18

2.2.3. ABTS ^{•+} radikali giderme aktivitesi.....	18
2.2.4. DPPH [•] giderme aktivitesi.....	19
2.2.5. FRAP metoduna göre indirgeme kuvveti tayini.....	19
2.2.6. CUPRAC metoduna göre indirgeme kuvveti tayini.....	19
2.2.7. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini.....	20
2.2.8. LC-MS/MS ile fenolik içerik analizi.....	20
2.2.8.1. Test çözeltisi olan bitki ekstresinin hazırlanması.....	20
2.2.8.2. Cihazlar ve LC-MS/MS için kromatografik koşullar.....	20
2.2.8.3. MS cihazlandırılması.....	21
3. BULGULAR.....	22
3.1. ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi Çalışma Bulguları.....	22
3.2. DPPH [•] Serbest Radikali Giderme Aktivitesi ile İlgili Çalışma Bulguları.....	23
3.3. FRAP Metodu ile İlgili Çalışma Bulguları.....	24
3.4. CUPRAC Metodu ile İlgili Çalışma Bulguları.....	25
3.5. Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Bulguları.....	26
3.6. LC-MS/MS ile Fenolik İçerik Analizi.....	26
4.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	30
5. KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	42

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN DEĞİŞİK *in vitro* METOTLAR İLE BELİRLENMESİ

Muhammed Nuri BİNGÖL

Tez Danışman: Doç. Dr. Ercan BURSAL

2016, 42 Sayfa

Doğal bitki kaynaklarının antioksidan, antiradikal, antimikrobiyal aktivitelerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmesi biyokimyacılar için popüler bir çalışma alanı olmuştur. Antioksidan bileşikler meyve, tohum, yaprak ve doğal bitkilerin yapraklarında bolca bulunur. Yapılmış olan birçok çalışma gösteriyor ki antioksidan içerikli doğal bitki kaynaklarının tüketimi doku hasarı, hücre ölümü, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, sinirsel düzensizlikler, deri iltihabı ve tahrişini azaltmaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı Türkiye’de yetişen *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. türünün yapraklarından elde edilen su ve etanol ekstratlarının antioksidan aktivitelerini belirlemektir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri ABTS, DPPH, CUPRAC, FRAP ve FTC *in vitro* metodlarına göre yapıldı ve sonuçlar BHA, BHT ve askorbik asit gibi standart antioksidanlarla karşılaştırıldı.

Ayrıca, *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinin fenolik bileşiklerin analizi UHPLC-MS yöntemi ile belirlendi. Çalışma sonuçlarına göre klorojenik asit, kuinik asit, hiperosid ve protokateşik asit gibi çok sayıda fenolik bileşikler olduğu tespit edilmiştir. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinin antioksidan kapasitesi, oksidasyon proseslerinde oluşan radikallerle reaksiyon veren bitkinin fenolik bileşikleriyle ilişkilidir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, fenolik bileşikler, *lavandulifolia*, serbest radikaller, *Stachys*

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *var. brachydon* Boiss. by DIFFERENT *in vitro* METHODS

Muhammed Nuri BİNGÖL

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ercan BURSAL

2016, Page: 42

Determinations of *in vivo* and *in vitro* antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of natural plant sources is one of the common area for biochemists. Antioxidant compounds are abundantly present in the fruits, seeds, leaves, and flowers of natural plants. Many of the previous studies have been shown that the consumption of plant sources that contain antioxidants reduce the risk of tissue damage, cell death, aging, cancer, cardiovascular diseases, neural disorders, skin irritations and inflammations.

The main purpose of this study is determining antioxidant activities of water and ethanol extracts that obtained from the leaves of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *var. brachydon* Boiss. species grown in Turkey. Antioxidant activities of extracts were determined according to the ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC and FTC *in vitro* methods and the results were compared with BHA, BHT and ascorbic acid which are used as standard antioxidants.

Also, phenolic composition of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *var. brachydon* Boiss. determined by UHPLC-MS methods. According to the result, many polyphenolic compounds such as chlorogenic acid, quinic acid, hyperoside and protocatechuic acid were mainly detected. The antioxidant capacity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *var. brachydon* Boiss. is associated with the presence of phenolic compounds, which react with the free radicals formed during the oxidation process

Keywords: Antioxidants, free radicals, *lavandulifolia*, phenolic compounds, *Stachys*

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1. Radikal ve radikal olmayan oksijen türleri.....	5
Çizelge 1.2. Hücre içi antioksidan savunma mekanizmaları.....	13
Çizelge 3.1. Standart olarak alınan fenolik bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri.....	27
Çizelge 3.2. <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachydon</i> Boiss. bitkisi fenolik bileşiklerinin kantitatif sonuçları.....	29

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachydon</i> Boiss. bitkisi.....	3
Şekil 3.1. Ekstrelerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS ⁺ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması.....	22
Şekil 3.2. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) DPPH [•] radikali giderme aktivitelerinin karşılaştırması.....	23
Şekil 3.3. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) değişik konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) FRAP metodu ile indirgeme kuvvetlerinin karşılaştırması	25
Şekil 3.4. <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachydon</i> Boiss. liyofilize su ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu ²⁺), kupröz iyonlarına (Cu ⁺) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidanlar ile karşılaştırması.....	25
Şekil 3.5. <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachydon</i> Boiss. liyofilize su ekstresinin 20 µg/ml farklı konsantrasyonlardaki Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite standart antioksidanlar ile karşılaştırılması.....	26
Şekil 3.6. UHPLC-ESI-MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin kalibrasyon kromatogramları.....	28
Şekil 3.7. UHPLC-ESI-MS/MS ile <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachydon</i> Boiss. ekstresinin kromatogramları.....	28

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABTS ^{•+}	:	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
FRAP	:	Ferric ion Reducing Antioxidant Power
BHT	:	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	:	Bütillenmiş Hidroksianisol
CUPRAC	:	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DPPH [•]	:	1,1- Difenil- 2- pikrilhidrazil
CAT	:	Katalaz
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
R [•]	:	Organik Radikali
ROO [•]	:	Peroksit Radikali
RO [•]	:	Alkoksi Radikali
OH [•]	:	Hidroksi Radikali
POD	:	Peroksidaz
LDL	:	Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
O ⁻²	:	Süperoksit Radikali
MDA	:	Malondialdehit
HOCl [•]	:	Hipokloröz asit
(¹ Δ ¹ O ₂)	:	Singlet oksijen
RCOO	:	Peroksil radikali
ONOO	:	Peroksinitrit
LOOH	:	Lipit peroksitleri
GST	:	Glutasyon –S- Transferazlar
GR	:	GlutasyonRedükta
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
GSH	:	Glutasyon
GSSG	:	Okside Glutasyon
GSSG-Rx	:	Glutasyon Redüktaz
%	:	Yüzde Değer
°C	:	Santigrat derece
•	:	Radikal
A	:	Alfa
dk	:	Dakika
M	:	Molar
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
mM	:	Milimolar

1. GİRİŞ

Çok eski zamanlardan beri insanların çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkileri kullandığı bilinmektedir. Günümüzde ise bitkilerin gıda, parfümeri ve süs eşyası olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bitkilerin besleyici ve ekonomik özelliklerinin yanında alternatif tıpta kullanımı eski zamanlardan beri yaygın bir şekilde artarak devam etmektedir. Bitkisel gıdalar; çeşitli kimyasal bileşiklerden oluşan ve insan sağlığı için önemli fonksiyonlara sahip maddelerdir. Bitkiler besleyici özelliklerinin yanında içerisinde bulunan antioksidan maddeler gibi insan sağlığı için önemli olan bileşenleri de bulundurmaktadır (Yeloğlu, 2012).

Günümüzde ise sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması bilim adamlarını farklı bir arayış içerisine yöneltmiştir. Bilim adamları, yapılan araştırmalar sonucunda bitkilerdeki karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşiklerin insan sağlığı için iyileştirici rollerini kanıtlamışlardır. Bu konuda yapılan araştırmalar arttıkça insanlığın bitki türüne ve bileşenlerine olan ilgisi de artmaya başlamıştır (Baştürk vd., 2015).

Bu çalışmada doğal antioksidan kaynağı olarak düşünülen ve hakkında daha önce yapılmış çok fazla çalışmaya literatürde rastlanılmamış *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinin antioksidan aktivitesinin tespiti ve fenolik içeriğinin tespiti amaçlanmaktadır.

1.1. *Stachys* Bitki Cinsi

Lamiaceae üyelerinin çoğunluğu tedavi amaçlı olarak kullanılmakta ve sahip oldukları uçucu yağlar ve aromatik bileşenlerinden dolayı da ekonomik olarak önemli bir familyadır. Kozmetik, parfümeri ve çeşitli gıda sanayide de kullanımı yaygındır (İşcan vd., 2015). Lamiaceae familya üyelerinin birçoğu baharat ve süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır. Lamiaceae üyelerinin bazılarının güzel görünüşü ve hoş kokulu olmasından dolayı kültürü yapılmakta ve kullanılmakta olan bitkiler ise genellikle uçucu yağlar, tanen ve acı maddeyi içerisinde bulundurmaktadırlar. Ağrı kesici, ateş düşürücü, iştah açıcı, gaz ve idrar söktürücü gibi özelliklere de sahiptir (Baytop, 1999).

Lamiaceae üyelerinin çoğunluğu tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak yetişen ve bol miktarda farklı kimyasal bileşenleri (fenolik, flavonoid, uçucu yağlar vb.) içeren dünya genelinde geniş yayılım gösteren aromatik bitkileri barındıran bir

familyadır. Lamiaceae familyası çift çenekliler içinde en gelişmiş familyalardan biri olarak kabul edilmektedir. *Stachys* cinsi tür sayısı bakımından dünyada 300-450 civarında tür içermekte olup, Lamiaceae familyasının en büyük ve en önemli cinslerinden biri olarak kabul edilmektedir.

Stachys otsu-küçük çalı formunda ve genellikle tek veya çok yıllık bir bitki taksonlarını içeren bir cinstir (Radulovic vd., 2007; Piozzi vd., 2011; Uğur vd., 2013 ;Dündar vd., 2013). *Stachys* cinsi ülkemizde 91 tür ve toplamda 116 takson ile temsil edilmektedir (Akçiçek vd., 2012). Morfolojik olarak 15 seksiyona ve 2 alt cinse ayrılan cinste, 55 endemik tür bulunmaktadır. Geleneksel tıpta *Stachys* cinsinin türleri insanlar tarafından çeşitli hastalıklarda (deri, solunum, ülser, toksik, kanser vb.) tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. *Stachys* cinsinin türleri üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar cinse ait bitki türlerinin ateş düşürücü, ağrı kesici, antitoksik, antioksidan ve özellikle uçucu yağlarının bazı kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyen inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir (Altınışik, 2000; Şerbetçi vd., 2012; Erdoğan vd., 2013).

1.1.1. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachyodon* Boiss. bitki türü

Stachys lavandulifolia var. *brachyodon* Boiss. türü Lamiaceae familyasına ait tıbbi ve aromatik bir bitkidir (Morteza, 2006). *Stachys lavandulifolia* var. *brachyodon* Boiss. türü genellikle yüksek dağların kaya yamaçlarında yayılış gösteren tek veya çok yıllık küçük çalı formunda ot denilebilecek bir bitki türüdür. Genellikle yaz aylarında çiçek verir. İran alternatif halk tıbbında, bu bitkinin toprak üstü kısımları analjezik ve anti-inflamatuar olarak kullanılmıştır (Hajhashemi, 2007). *Stachys* cinsinin farklı türlerine ait ekstraktların antibakteriyel, antitoksik, antihepatit, hipotansif ve antianksiyete özellikleri önceden farmakolojik çalışmalar doğrultusunda rapor edilmiştir (Haznagy, 2006).

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachyodon* Boiss. mide, bağırsak ve solunum bozukluklarının tedavisinde kullanıldığı, iştah açıcı, gaz giderici, uyarıcı, sindirim, idrar arttırıcı ve ağrı kesici olarak da görev yaptığı belirtilmiştir (Şerbetçi, 2010). *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachyodon* Boiss. ile ilgili bilimsel çalışmalarda bu bitkinin flavonoidler, kinonlar, iridoidler, fenolik asitler ve diterpenler gibi sekonder metabolitlerce zengin olduğu belirtilmiştir (Altun vd., 2010). *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachyodon* Boiss. içeriğindeki kimyasal bileşenlerden dolayı önemli olup, alternatif tıp ilacı olarak yıllardan beri kullanılmaktadır. Halk arasında “dağ çayı”

olarak çayı tüketilmekte ve alternatif tıpta tedavi edici olarak deri hastalıkları, sindirim rahatsızlıkları, sinirsel hastalıklar ile astım, tümör ve epilepsi gibi pek çok hastalıkların tedavisinde de kullanımı yaygındır (Johnson, 1999).



Şekil 1.1. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisi (Foto: Ö.Kılıç)

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinin sistematiki aşağıda gösterilmiştir.

Alem	:	Plantae
Alt alem	:	Tracheobionta
şube	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Alt sınıf	:	Asteridae
Takım	:	Lamiales
Aile	:	Lamiaceae
Cins	:	<i>Stachys</i>
Tr	:	<i>Stachys lavandulifolia</i>
Varyete	:	<i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl. var. <i>brachydon</i> Boiss.

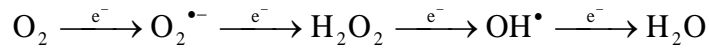
1.2. Serbest Radikaller

Canlı vücudu yaşamsal olaylar için enerji üretirken, sürekli serbest radikal oluşmasına neden olur. Çevrenin kirletici etkisi, kimyasal ürünler, endüstriyel atıklar, toksik ilaçlar, güneşin zararlı ışınları, bağımlılık yapan maddeler ve stres gibi pek çok etken vücudumuzdaki serbest radikallerin sayısını sürekli olarak artırır (Sies, 1991).

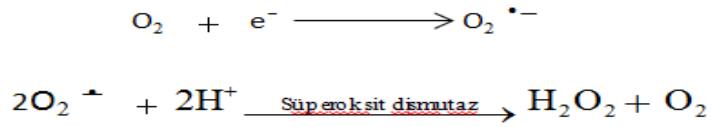
şeker ve yağ oranı yüksek olan gıdalar, aşırı yapılan spor aktiviteleri de oksijen miktarında artışa sebep olacağı için buna bağlı olarak serbest radikallerinde artmasına neden olmaktadır. Radikallerin artması sonucu vücuttaki hücreler hasara uğrar, bağışıklık sistemimiz zayıflar ve bunun sonucunda da çeşitli hastalıklar meydana gelir (Sayan, 2000).

Reaktif oksijen türleri insan vücudunda normal metabolik olaylar sonucunda sürekli olarak üretilmektedirler (Langseth, 1995). Serbest radikaller vücuttaki birçok metabolik olayda önemli rol oynamakta, vücuttaki biyokimyasal reaksiyonların başlıca yan ürünü olduğu, biyolojik moleküllere etki ederek hastalıklara neden olduğu ve hücre ya da doku hasarına yol açtığı bilinmektedir (Uysal, 1998). Oksijen oksidatif metabolizma sırasında enerji elde etmek için O₂'in kısmi indirgenmesi sonucu az bir kısmı da ortaklanmamış elektronu bulunan serbest radikallere dönüşür (Altop ve Erener, 2009).

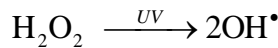
Yüksek indirgeme potansiyeline sahip elektronlar, mitokondri iç membranında elektron transport sistemi ile moleküler oksijene (O₂) transfer edilir. Mitokondriyal elektron transport sisteminde, elektronların O₂'e transferi sırasında oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri oluşur. Bu ürünler çok reaktif yapıdadır ve biyomoleküllerin yapılarına girerek geri dönüşümsüz hasarlara sebep olabilirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Bu reaktif oksijen türlerinden olan O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•] oluşum reaksiyonları aşağıda verilmiştir.



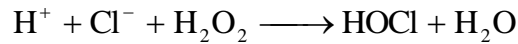
Moleküler oksijenin (O₂) mitokondriyal elektron transport sisteminde bir elektron alması sonucu süperoksit radikali (O₂^{•-}) oluşur. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini inhibe eder.



Hidrojen peroksit (H₂O₂) eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal olmayan fakat kimyasal olarak reaktif olan bir oksijen türüdür. Hidrojen peroksit, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile çok güçlü bir reaktif olan hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturur. Aynı zamanda hidrojen peroksitin UV ışınlarının etkisiyle OH[•] dönüştüğü de bilinmektedir.

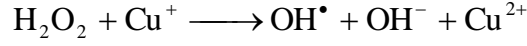
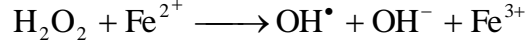


Ayrıca hidrojen peroksit reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (Bursal, 2013; Asad vd., 2004).

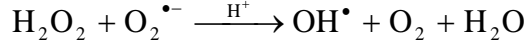


Hidroksil radikali; lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok güçlü bir şekilde saldırarak oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakan ve yarı ömrü 10⁻⁹ saniye gibi çok kısa olan bir reaktif oksijen türüdür. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucunda açığa çıkar. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir (Nordberg ve Arner, 2001).

Fenton Reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



Gerek iç gerekse dış etmenler (pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler, stres, radyasyon vb.) organizmada serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Radikaller son elektron yörüngesinde ortaklanmamış elektronu bulunun hareketli, diğer moleküllerle etkileşim eğilimde olan kimyasal olarak çok reaktif olan moleküllerdir (Akyüz, 2007). Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil (OH^\bullet), singlet oksijen radikali ($^1\text{O}_2$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit (ONOO^-) reaktif oksijen türlerinin bir kaçına örnektir. Serbest radikaller ortaklanmamış elektronu bulundurmasından dolayı lipitler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi moleküllerle etkileşimde bulunarak onların yapılarını hasara uğratar ve böylece yaşlanma, kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar, sinirsel hastalıklar, katarakt ve kalıtsal pek çok hastalığın meydana gelmesine sebebiyet verirler (Arınduru ve Arabacı, 2013).

Oksidanlar tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilenler ve elektron eksikliği olmadığı halde başka moleküllerle, radikallerden daha zayıf olarak birleşenler (non-radikal) olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Erbaş, 1993). Bu oksidan maddelerden, süperoksit radikali, hidroksil radikali, alkoksil radikali, peroksil radikali ve hiperoksi radikali, radikal özellikte iken; hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hipoklorit ise radikal olmayan özelliktedirler (Basta vd., 1991). Doğal oksijen molekülünün çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron alması ile süperoksit radikali oluşur (Özdemir, 1993). En önemli serbest radikaller biyolojik sistemlerdeki oksijen kaynaklı radikallerdir. Reaktif oksijen türlerinin radikal ve radikal olmayan formları Çizelge 1.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Radikal ve radikal olmayan oksijen türleri

<u>Radikal türler</u>	<u>Radikal olmayan türler</u>
Süperoksit, $O_2^{\bullet-}$	Hipokloröz asit, HOCl
Hidroksil, $\bullet OH$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Peroksil, RO_2^{\bullet}	Singlet oksijen
Alkoksil, RO^{\bullet}	Peroksinitrit, $ONOO^{\bullet-}$
Hidroksiperoksil, HO_2^{\bullet}	Moleküler oksijen, O_2

1.2.1. Serbest radikal oluşum kaynakları

Serbest radikallerin meydana gelmesi organizma canlılığını devam ettirdiği sürece, normal biyolojik işlemler sırasında oluşmasının yanı sıra, yabancı maddelerin vücuda girmesi durumunda da az çok oluşur. Sigara dumanının etkisi, kirli hava, kimyasal gazlar, nitrojen dioksit, benzen, kükürt dioksit gibi inhale edilebilen ksenobiyotikler de oksidan madde miktarını artırır.

Bağımlılık yapıcı maddeler de homeostazisi bozmaları nedeniyle oksidan oluşumunu arttırmaktadırlar (Özdemir, 1993). Ayrıca organizmada serbest Fe ve Cu gibi minerallerin vücutta fazla olması da oksidan madde oluşumunu artırır.

Normal biyolojik işlemlerden mitokondrideki O_2 'li solunum sırasında Elektron Transfer Sistemi (ETS)'nde, katabolik ve anabolik reaksiyonlar, endoplazmik retikulumda sitokrom P450 sisteminde meydana gelen elektron kayıpları sonucunda oksidanların oluşması kaçınılmazdır (Cochrone, 1991).

İskemi, hemoraji, travma, entoksikasyonlar, radyoaktivite veya alerjik durumlarda mitokondrilerdeki aerobik solunum reaksiyon dengesi etkileneceği için, ETS sisteminden elektron kaçakları daha fazla olacak ve oksidan maddelerin miktarı da artacaktır. Ayrıca hücre içinde oksidanların artması lipidlerin peroksidasyonunu ve proteinin dekarboksilasyonunu da tetikler (Steinberg, 1991).

1.2.2. Serbest radikallerin etkileri

Başlıca glikoz oksidasyonu olmak üzere bütün metabolizma olaylarında açığa çıkan oksidan maddeler, belirli bir düzeyde kaldığı sürece canlıya zarar vermemekte, hatta canlıyı ksenobiyotiklere karşı korumada önemli bir savunma molekülüdür. Ancak iç ve dış etkenlerin etkisi ile oksidan maddelerin normalin üzerine çıkması organizmanın zarar görmesine neden olmaktadır (Steinbeg, 1991; Jacopson vd., 1993). Herhangi bir nedenden ötürü aşırı artış gösteren oksidan maddeler; nükleik asitlere, lipitlere, proteinlere, enzimlere ve karbonhidratlara etki ederek hücre hasarı ve ölümü ile sonuçlanan etkilere neden olmaktadır (Altan vd., 2006).

1.2.2.1. Lipitler üzerine etkileri

Oksidanların lipitler üzerindeki etkileri lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipitler doymamış yağ asidi ve birden fazla çift bağ içermelerinden dolayı serbest radikallerin açık hedefi halindedirler (Silinsin, 2016). Radikallerin lipitlerle reaksiyonu sonucu, lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler oluşur. Bunun sonucunda aterosklerotik plaklar oluşmakta, plak oluşumundan dolayı ise kardiyovasküler hastalıklar meydana gelmektedir (Nordberg ve Arner, 2001). Bu sebeplerden dolayı, lipit peroksidasyonunun engellenmesi veya azaltılması insan sağlığı için önemlidir.

Serbest radikallerin metilen grubundan bir hidrojen çıkarması ile lipit peroksidasyonu başlayabilir. Oksijen radikal oluşturmak için karbon radikaline bağlanır. Sonuç olarak diğer lipit molekülünden bir atom çıkarılarak lipit hidroksili radikali meydana gelir. Bu düzenleme ile endoperoksitler ileri düzeyde oksidasyon sonucunda melandialdehit (MDA) meydana getirir (Erenel vd., 1992). Melandialdehit hücre membranlarında iyon geçişlerine etki ederek bileşiklerin çapraz bağlanmasını sağlar, iyon geçirgenliğini azaltır ve enzim aktivitelerini düşürerek olumsuz sonuçlar meydana getirirler.

1.2.2.2. Proteinler üzerine etkisi

Serbest radikal türleri, bazı aminoasit kalıntıları ile reaksiyona girerek modifiye edilmiş fonksiyonel olmayan proteinleri oluşturmaktadır (Netto vd., 2002). Serbest radikallerden en kolay etkilenen aminoasitler, sülfür veya selenyum içeren kalıntılardır.

Serbest radikaller aminoasit yan zincirlerinin değişimine sebebiyet verebilir. Protein yapısında bulunan karbonil grupların artması, onları serbest radikallerin kolayca

etkileyebileceği hedef haline getirir. Peptit bağlarını kırabilir. Hücre membranındaki proteinlere zarar vererek hücre ölümlerine neden olabilir. Enzimler de yapıcı proteinlerden meydana geldiği için, serbest radikaller enzimlerin de çalışmasını engelleyebilir (Shacter, 2000).

Serbest radikallerin proteinlerin yapısında meydana getirdiği olumsuz etkileri şu şekilde sıralayabiliriz (Erenel vd., 1992);

- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- Proteinlerin fragmantasyonu,
- Proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalar.

1.2.2.3. Karbonhidrat yapısına olan etkileri

Serbest radikallerin etkisi ile monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu (hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehid) yapısında serbest radikaller oluşmaktadır. Okzoaldehidler gibi radikaller, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliklerinden dolayı enzimatik etki göstermektedirler. Bu yüzden kanser ve yaşlanma gibi insan yaşamını olumsuz etkileyen oluşumlar üzerinde etkili oldukları tahmin edilmektedir (İşbilir, 2008).

1.2.2.4. DNA yapısına olan etkileri

İyonize edici radyasyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller mutasyonlara neden oldukları ve DNA'yı önemli derecede hasara uğrattıkları bilinmektedir. DNA'nın yarılması, DNA-protein çapraz bağları, pürinlerin otooksidasyonu gibi bazı durumlar serbest radikallerin özellikle de hidroksil radikalının sebep olduğu hasarlardır (Cooke vd., 2003). Ayrıca aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membrandan geçerek hücre çekirdeğinde hasarlara neden olmaktadır (Ames vd., 1993). Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınlarında meydana gelirse purin ve pirimidin bazlarını etkileyerek mutasyonlara neden olur. Singlet oksijen radikalının nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha kısıtlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkime verirler.

1.2.3. Serbest radikal düzeylerini değiştiren faktörler

Radikaller hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı olarak meydana gelmektedirler. Ekzojen kaynaklı durumlar arasında; kimyasallara maruz kalma, ilaçların zararlı etkileri, UV ışınlar, radyasyon, sigara, alkol ve çevre kirliliği gibi pek çok etken örnek gösterilebilir (Gülçin vd., 2003). Endojen etkilerin neden olduğu durumlar; stres, yaşlanma, doku hasarı ve çeşitli kronik hastalıklar örnek verilebilir, bunun dışında hava kirliliği, kimyasal atıklar, zirai ilaçlar, madde bağımlılığı gibi etmenler de serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (Yavuzer vd., 1991).

Genellikle aşırı derecede yapılan spor aktiviteleri organizmada serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır. Buna karşın düzenli yapılan egzersizlere organizma adapte olduğu için, antioksidan, enzim aktivitesinin artması, inflamasyon eğiliminin ve serbest demir düzeylerinin düşmesi, DNA tamir mekanizmalarının engellendiği ve LDL'nin oksidasyona olan duyarlılığını azalttığı tespit edilmiştir (Aslan, 1999).

Serbest radikallerin oluşumunun engellenmesinde ilk aşama stres oluşumunu engellemektir. Ayrıca doku hasarı ile oksidan oluşumuna neden olan biyokimyasal reaksiyonların inhibe edilmesi ve oksidan madde salgılayan hücrelerin inaktive edilmesi de etkili bir yöntemdir. Oksidan üretimi kaçınılmaz olduğu için, üretilen oksidan maddelere bağlı olarak gelişecek hasarı önlemek için onları etkisizleştirecek antioksidan maddelerin kullanılması gerekir. Antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile oksidan oluşumunu engeller ve onlarla etkileşime girerek (bir hidrojen aktarmak suretiyle) oksidanları inaktif hale getirirler. Örneğin; vitaminler, flavanoidler ve mannitol antioksidan etkiye sahiptirler. Hemoglobun, seruloplazmin ve ağır mineraller de oksidan maddeleri kendilerine bağlayarak, oksidan zincirleri kırabilirler (Steinberg, 1991; Basta vd., 1993).

1.3. Antioksidanlar

Son yıllarda gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanların (BHT, BHA,) zararlı etkileri ve kanserojen etkisi tamamen kabul edilmektedir (Gülçin vd., 2011). Dolayısıyla tüm dünyada gıda ve tıp alanında doğal antioksidanlara olan eğilim giderek artmaktadır (Madhavi vd., 1996). Yapılan bilimsel çalışmalar doğal antioksidanların sentetik antioksidanlara kıyasla daha güvenilir olması ve yan etkilerinin olmaması nedeni ile sentetik antioksidanlara göre daha fazla tercih edilmesi giderek

yaygın hale gelmiştir (Pellegrini vd., 2009; Tozoğlu, 2011). Organizmada serbest radikallere karşı süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzim yapısındaki antioksidanlar sürekli üretilmekte olup ve serbest radikallere karşı organizmayı savunmaktadırlar. Dışarıdan aldığımız gıdaların antioksidan özellikleri, antioksidan savunma sistemimizin güçlenmesine katkı sağlamaktadır (Pellegrini vd., 2009; Yılmaz, 2010; Akkuş, 1995).

Doğal antioksidanlar, bitkisel ve hayvansal dokularda bulunan ve ekstrakte olabilen veya gıdaların işlenmesi aşamasında açığa çıkan yararlı bileşenlerdir. Başlıca bilinen doğal antioksidanlara; tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C, karotenoidler, polifenoller ve selenyum örnek verilebilir (Doğmuş ve Durucasu, 2013).

Bunlara ek olarak, diyetle alınan gıdaların antioksidan özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar artarak devam etmekte ve antioksidanların insan sağlığına olumlu etkisi konusuna toplumun da ilgisi artarak devam etmektedir. Antioksidanlar gıdaların içeriğinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Maillard tepkimesindeki gibi gıdalardaki kimyasal prosesler sonucunda da antioksidanlar oluşmakta ve bu doğal antioksidanlardan ekstre elde edilerek gıdalara katılabilir. Gıdaların içerisinde bulunan başlıca antioksidan bileşikler fenoliklerdir. Özellikle tükettiğimiz meyve ve sebzelerin içerisinde bol miktarlarda fenolik bileşikler bulunmakta ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip özellik göstermektedir. Yapılan bazı laboratuvar çalışmaları, meyve ve sebzelerin bol miktarda tüketimi ile çeşitli kalp-damar hastalıkları, kanser ve diğer bazı kronik hastalıkların oluşumunun azaldığını göstermektedir. Meyve ve sebzelerde bulunan bazı antioksidanlar, bazı vitaminler (C ve E) ve karotenoidler, antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirmekte ve organizmayı hastalıklardan korumada etkili olduğunu göstermektedir (Davies, 2000; Hasler, 2000).

1.3.1. Antioksidan savunma sistemi

Organizmanın normal metabolik faaliyetleri sonucunda serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda tüm aerobik organizmalar serbest radikallere karşı doku hasarını korumak için antioksidan savunma mekanizması geliştirmiştir. Antioksidanlar daha küçük konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonuna engelleyen ve azaltan maddelerdir. Normal şartlarda oksidan etkenler ve antioksidanlar denge halindedir, fakat oksidan miktarı arttığı zaman doku hasarlarına neden olmaktadır (Aslan, 1999).

Antioksidanların, oksidatif sürecin değişik aşamalarında beş değişik mekanizmada görev aldıkları savunulmaktadır. Bu mekanizmalar;

1. Lokal oksijenin konsantrasyonunu dūřürme

2. $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} gibi anahtar reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırma yoluyla zincir reaksiyonlarının başlamasını engelleme

3. Peroksitleri parçalayarak onların zincir reaksiyonu oluşturan radikallere dönüşümünü engelleme

4. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak, radikal oluşumunun başlamasını engelleme

5. Başlamış olan bir radikal zincir reaksiyonunu kırma

Bu mekanizmalardan ilk ikisi ile işlev gören antioksidanlar, birincil savunma hattını oluşturmaktadır. Enzim olmaları nedeniyle, normal koşullarda antioksidan görevleri bitince değişmeden ortamdan kalkarlar. Son üç mekanizma ile işlev gören antioksidanlar ise ikincil savunma hattını oluşturmaktadır.

Organizmada oksijen üretimi sırasında sürekli oluşan radikallerin oluşumunun engellenmesi ve bunun yanında doku hasarlarının önüne geçilmesinde çeşitli antioksidan savunma sistemleri mevcuttur.

Çizelge 1.2. Hücre içi antioksidan savunma mekanizmaları (Kanbak, 1994)

1. Enzimatik Savunma

Süperoksit Dismutaz (SOD)
Glutasyon Peroksidaz
Katalaz
Glutasyon Redüktaz
NADPH-Kinonoksidoredüktaz (DT-diaforaz)
Epoksit Hidrolaz
UDP-Gluktonil Transferaz
Sülfonil Transferaz
GSH-S- Transferaz
Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
İzositrat Dehidrojenaz
Malik Enzim

2. Enzimatik Olmayan Savunma

Redükte Glutasyon (GSH)
 α -Tokoferol
Askorbik Asit
 β -Karoten
Ürat
Plazma Proteinleri (Serüloplazmin)

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidirler. Antioksidanlar; serbest radikal oluşumunu önleyerek veya oluşan serbest radikallerin etkisini gidererek etki gösterirler.

Antioksidanların serbest radikal oluşumunu önleme etkileri üç şekilde olur:

- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

Antioksidanların oluşan serbest radikalleri giderme etkisi ise dört şekilde olur.

- Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest radikal türlerine etki ederek onları tutma veya çok daha etkisiz başka bir moleküle çevirme

- Bastırıcı (quencher) etki: Serbest radikaller ile etkileşerek onlara bir proton transfer ederek aktivite kaybına neden olma
- Onarıcı (repair) etki: Hedef molekülleri hasar sonrası tamir veya temizleme.
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest radikaller ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleme (Kanbak, 1994; Biçim, 2013).

1.3.2. Antioksidan molekül türleri

1.3.2.1. Askorbik asit (C vitamini)

Askorbik asit, meyvelerde bol miktarda bulunan C vitaminidir. Özellikle biber, maydanoz, turunçgiller ve ıspanakta bol miktarda bulunmaktadır. Hayvansal ve bitkisel dokularda yüksek konsantrasyonda mevcuttur. İnsan kan plazması 100 ml' de 1 mg kadar askorbik asit içerir. Çoğu yüksek hayvanlar ve bitkiler askorbik asidi glukoz ve diğer basit öncül maddelerden sentezlerler. Askorbik asidin kuvvetli indirgen özelliği süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca ve etkin bir şekilde reaksiyona girerek iyi bir antioksidan olarak görev yapma kapasitesini sağlar. Askorbik asit fotooksidasyona karşı retina ve lens dokularını korur ve katarakt oluşumunu geciktirebilir (Zulueta vd., 2007).

1.3.2.2. Tokoferoller (E vitamini)

E vitamini en yaygın olarak kullanılan ve en iyi bilinen antioksidandır. Eser miktarda da olsa gıdaların çoğunda bulunmaktadır. Tokoferoller, E vitamininin en aktif formudur. Lipitlerde hidroksil grubundan bir hidrojen alarak peroksil radikalini etkisiz hale getirerek aktivite gösterirler. Tokoferolün aynı zamanda hidroperoksitlerin dekompozisyonunu yavaşlattıkları bilinmektedir. Tokoferoller ısıya karşı oldukça dirençlidirler. Tokoferolün oksidatif stabiliteyi artırıcı ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. E vitamininin kalp ve damar hastalıkları üzerinde olumlu etkileri ve özellikle hastalık riskini azaltıcı etkisi bulunmaktadır (Koç ve Üstün, 2008).

1.3.2.3. β -Karoten (A vitamini)

Yapılan bilimsel çalışmalar A vitamininin yağda çözünen ilk vitaminlerden olduğunu bildirmektedir. A vitamininin metabolik formu olan β -karoten güçlü bir

singlet oksijen radikali temizleyicisidir. Hidroksil, peroksil ve alkoksil serbest radikalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu engeller. β -karoten oksijen ile kolayca oksitlenir. Görme, üreme, büyüme ve epitel hücre sağlamlığında önemli rol oynamaktadır (Çaylak, 2011).

1.3.2.4. Melatonin

Melatonin hormonu uyku, üreme gibi biyolojik fonksiyonları düzenleyen güçlü bir antioksidandır. Hidroksil radikaline etki etmektedir. İlk kez 1991'de antioksidan olarak öngörülmüş ve daha sonra yapılan laboratuvar çalışmalar ile de kabul edilmiştir. Hidroksil, peroksit ve singlet oksijen gibi radikalleri etkisizleştirdiği bilinmektedir. Suda ve yağda çözünebildiğinden dolayı diğer antioksidanlara göre daha geniş alanda antioksidan aktivite göstermektedir (Aydemir vd., 2009). Melatoninin yaşlanma ile azaldığı ve yağlanmadan dolayı oluşan hastalıklarda önemli bir etken olduğu teyit edilmektedir. Klinik açıdan iyi bir antioksidan olduğunu ve antikanserojen olduğu düşünülmektedir. Melatoninin diğer antioksidanlara oranla çok güçlü bir antioksidan etki göstermesinin nedenlerini şu şekilde sıralanabilir;

- İyi bir çözünen (lipofilik) olması nedeniyle hücrenin hücreler arası tüm ve organellerine, birçok dokuya kolayca girerek geniş bir alanda aktivite göstermektedir.
- Lipofilik olması nedeniyle hücre çekirdeğine girebilir ve DNA'yı oksidatif hasara karşı korur.
- Çok yüksek miktarlarda ve uzun süreli kullanımlar da bile toksik bir etkisi yoktur.
- Prooksidan aktiviteye sahip değildir.

1.3.2.5. Folik asit (B₁₀₋₁₁ Vitamini)

Folik asit, hücre yapı taşlarının, kan hücrelerinin ve özellikle de sinir sistemi dokularının oluşum ve gelişimde önemli bir role sahip olan B vitamini türevidir. Özellikle genetik şifremizin yapıtaşları olan DNA yapımında görev alır. Sinir sistemi için gerekli olan bir vitamindir. Dopamin, serotonin, nöroepinefrin gibi nörotransmitter maddelerin sentezinde rol oynar.

1.3.2.6. Fenolik bileşikler

Bitkilerin çoğunda bulunan fenolik bileşikler, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini temsil etmekte ve insan sağlığı için önemli olan bileşiklerdir (Silinsin, 2016). Fenolik bileşikler önemli antioksidan aktivite gösteren kimyasal yapılara sahiptirler. Polifenoller, aromatik yapılarında birden fazla hidroksil grubu taşıyan yapılardır. Bitki polifenollerinin antioksidan karakterleri, indirgeyici ve hidrojen atomu verici olmalarıyla sağlanır (Nichenametla, 2006). Bazı polifenoller ise metal iyonlarını şelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak etkilidirler. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük derişimler de bulduklarından, otoksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonları erteleme, geciktirme ya da önleme özelliklerine sahip olmalıdır.
- Süpürme (scavenging) sonunda oluşan serbest radikal, oksidasyonun zincir reaksiyonunu kırmada kararlı yapıya sahip olmalıdır (Karaman, 2008; Silinsin, 2016).

Polifenolik bileşikler, öncül maddeleri fenol olan, güneş ışığı yardımıyla bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde oluşan organik bileşiklerdir. Suda orta derecede organik çözücülerde ise iyi çözünürler. Flavonoidler, bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Bitkilerin güneş ışığına rağmen gelişmeleri bu pigmentlerin çok fazla miktarda sentezlemesiyle mümkün olabilmektedir. İnsanlarda flavonoidler, bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır (Jung vd., 2005; Bursal, 2009).

Polifenolik bileşikler, lipit peroksidasyonu gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini giderirler, metal iyonları şelatlarlar ve oksidasyonu azaltarak antioksidan özellik gösterirler (Stevenson ve Hurst, 2007).

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan bitki materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyali olan *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitki türü, 21.06.2014 tarihinde Bingöl ilinde bulunan Dikme yaylasının kuzeyindeki taşlık alandan toplanmıştır. Bitkinin türünün teşhisi Flora of Turkey, 7.cilte göre (Davis, 1982), Bingöl Üniversitesi Teknik Bil. MYO. Öğretim üyesi Doç. Dr. Ömer KILIÇ tarafından yapılmıştır. Bitki numuneleri Bingöl Üniversitesi, Park ve Bahçeler Bölümü herbaryumunda saklanmaktadır.

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Antioksidan kapasite belirleme için yapılan metotlarda kullanılmak üzere; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) radikali, ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit), Linoleik asit ve Tween-20 Sigma-Aldrich'ten satın alındı. FeCl₂, NH₄SCN, potasyum persülfat (K₂O₈S₂), Na₂HPO₄, K₃Fe(CN)₆, TCA (triklor asetik asit), FeCl₃, etanol ve saf su Muş Alparslan Üniversitesi Kimya Bölümü laboratuvarından temin edildi.

2.1.3. Yararlanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1800
Derin dondurucu	Arçelik
pH-metre	Thermoscientific
Hassas terazi	RADWAG AS220/C/2
Otomatik pipetler	A.D.R. Group
Vorteks	Fisons, Whirlimixer
Evaporatör	IKA-Labotechnik
Saf su cihazı	Nüve NS103
Magnetik karıştırıcı	MK 350
UV-Spektrofotometre küveti	3 cm ³ 'lük quartz küvet

2.2. Metot

2.2.1. Numunenin su ekstresinin hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız bitkinin yaprak kısımları toplandı ve güneşte kurutulduktan sonra blender (parçalayıcı) cihazı ile parçalandı. Bitkinin su ekstresini hazırlamak için parçalanmış numuneden 50 gram alınarak üzerine 100 ml saf su ilave edildi. Oda sıcaklığında 12 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Karışım süzgeç kağıdından süzülerek süzüntüler alındı ve geriye kalan bitki posası tekrar 100 ml saf su ile 12 saat manyetik karıştırıcı üzerinde tekrar ekstrakte edildi ve süzüldü. Süzüntü ekstratları birleştirildikten sonra cam balonlara alındı ve derin dondurucuya konuldu. Dondurulmuş ekstratlar 50 mm Hg basınç altında liyofilizatör cihazında kuru olana kadar liyofilize edildi. Liyofilize edilmiş numuneden 20 mg alınarak 20 ml saf suda çözüldü ve stok çözelti hazırlandı.

2.2.2. Numunenin etanol ekstresinin hazırlanması

Bitkinin etanol ekstresinin hazırlanması için parçalanarak ufaltılmış 50 gr bitki numunesi üzerine 100 ml etanol ilave edildi. Oda sıcaklığında 12 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Karışım süzgeç kağıdından süzülerek süzüntüler alındı ve geriye kalan bitki posası tekrar 100 ml etanol ile 12 saat manyetik karıştırıcı üzerinde tekrar ekstrakte edildi ve süzüldü. Süzüntü ekstratları birleştirildikten sonra cam balonlara alındı ve rotary evaporatör cihazında etanol tamamen uzaklaştırıldı. Bu numuneden 20 mg alınarak 20 ml etanol de çözüldü ve stok çözelti hazırlandı.

2.2.3. ABTS^{•+} Radikali giderme aktivitesi

Ekstrelerinin ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) radikali giderme aktivitesi (Re vd., 1999) yaptığı çalışmaya göre belirlendi. Öncelikle 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilere 2.45 mM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS^{•+} radikalleri üretildi. ABTS^{•+} radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0.1 M ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.750±0.025 nm'ye ayarlandı. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesine bakılan ekstratlarının farklı konsantrasyonlarına birer ml ABTS^{•+} radikal çözeltisi ilave edilerek ve 30 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanslar kaydedildi.

2.2.4. DPPH' Giderme aktivitesi

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinden elde edilen ekstrelerin serbest radikali giderme aktivitesi DPPH' (1,1-difenil 2-pikril hidrazil) için Blois metodunun (1958) geliştirilmiş bir formuna göre gerçekleştirildi (Bursal ve Gülçin, 2011). Bu işlem için öncelikle serbest radikal çözeltisi hazırlandı. DPPH' serbest radikalinden 39 mg alındı ve 100 ml etanol de çözülerek 1 MM DPPH' serbest radikali çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti olarak hazırlanan numunelerden deney tüplerine sırasıyla değişik konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) numuneler aktarıldı ve toplam hacimleri etanol ile 3 ml' ye tamamlandı. Daha sonra her bir numuneye etanolik DPPH' çözeltisinden birer ml ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübe edildi. Daha sonra spektrofotometre cihazında 517 nm'de absorbanslar ölçüldü. Kör olarak sadece etanol den oluşan absorbans kaydedildi. Kontrol olarak 3 ml etanol ve 1 ml DPPH' çözeltisinden oluşan numune kullanıldı. Absorbansta meydana gelen düşüş giderilmiş olan DPPH' çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini göstermektedir.

2.2.5. FRAP Metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. su ve etanol ekstrelerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvveti Oyaizu (1986) metodunun geliştirilmiş bir formuna göre gerçekleştirildi (Bursal, 2009). Bu amaçla daha önceden hazırlanan olan stok çözeltiler kullanıldı. Stok çözeltilerin değişik konsantrasyonlarını içeren numunelerden alınarak deney tüplerine aktarıldı ve saf suyla hacim 1 ml'ye tamamlandı. Her bir tüpe 2.5 mL fosfat tamponundan (0.2 M; pH 6.6) ve 2.5 ml potasyum ferrisiyanür (%1'lik) eklendikten sonra 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımına 2.5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Bu çözeltiden 2.5 ml alındı ve bunun üzerine 2.5 ml saf su ve 0.5 ml $FeCl_3$ (% 0.1'lik) ilave edildikten sonra 700 nm'de absorbanslar ölçüldü.

2.2.6. CUPRAC Metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. su ve etanol ekstrelerinin kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi Apak ve arkadaşlarının kullandığı Cuprac metodunun (2006) hafif bir modifikasyonuna göre yapıldı. Bunu için deney tüplerine 0.01 M'lık 0.25 ml $CuCl_2$ çözeltisi ilave edildi. Bunun üzerine 0.25 ml 7.5×10^{-3} M'lık

etanolik neokuprin çözeltisi ve 1 M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) ekstratlar ve standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon (Cu²⁺) indirgeme kapasitesini göstermektedir.

2.2.7. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Öncelikle stok çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla 20 mg su ekstresi 20 ml saf suda ve yine aynı şekilde 20 mg etanol ekstresi ise 20 ml etanol de çözünerek hazırlandı. İstenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözelti, vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2.5 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2.5 ml linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2.5 ml tampon çözelti ve 2.5 ml linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37°C'de gerçekleştirildi. Her on saatte bir vezin kaplarından 100'er µl alındı 4.7 ml etanol bulunan deney tüplerine konuldu 100 µl Fe²⁺ çözeltisi daha sonra da 100 µl SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 4.8 ml etanol bulunan deney tüpüne 100 µl Fe²⁺ ve 100 µl SCN⁻ çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin 500 nm'deki absorbansları köre karşı okundu (Wang vd., 2006).

2.2.8. LC-MS/MS ile fenolik içerik analizi

2.2.8.1. Test çözeltisi olan bitki ekstresinin hazırlanması

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 100 g numune oda sıcaklığında 3 defa 300 ml metanol ile 24 saat boyunca ekstrakte edildi. Çözücü rotary evaporator ile 30°C'de, kuru metanol ekstratları (% 15.6 verim) elde edilene kadar uzaklaştırıldı. Kuru filtreler 1000 mg/L'ye seyreltildi ve LC-MS/MS analizi için 0.2 µm mikrofiber filtre ile filtre edildi.

2.2.8.2. Cihazlar ve LC-MS/MS için kromatografik koşullar

LC-MS/MS ile fenolik bileşiklerin analizi, ikili MS cihazı bağlanmış bir Nexera modeli Shimadzu HPLC kullanılarak yapıldı. Sıvı kromatografisi LC-30AD ikili pompa, DGU-20A3R degazör, KTO-10AS vp kolon fırını ve SIL-30AC otomatik örnekleyici ile donatılmıştır. Kromatografik ayırma, bir C18 ters-faz analitik kolonu

Inertsil ODS-4 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) ile gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C de sabit tutuldu. Elüsyon gradienti mobil faz A (su, 5 mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol, 5 mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ile oluşturuldu. Gradyant programı B çözücüsünün aşağıdaki değerlerine göre t (dk) uygulanmıştır. B%: (0, 40), (20, 90), (23.99, 90), (24, 40), (29, 40). Çözücü akış hızı 0.5 ml/dk olarak uygulandı ve enjeksiyon hacmi 4 µl olarak ayarlandı.

2.2.8.3. MS cihazlandırılması

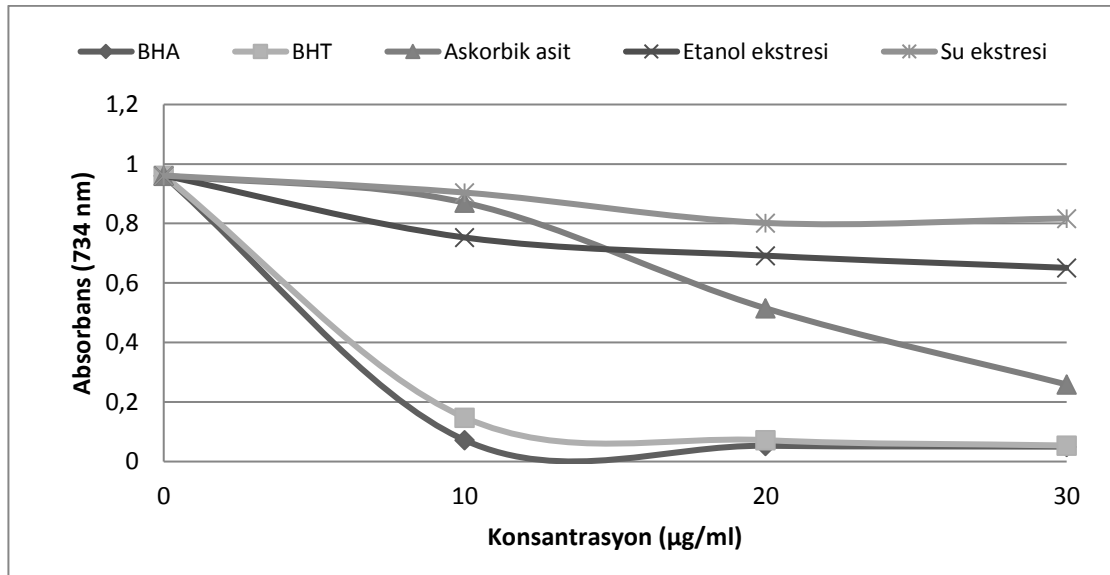
MS tespiti Shimadzu LCMS 8040 modeli üçlü, dört kutuplu ve hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında ESI kaynak işletimi ile donatılmış kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı. LC-MS/MS verileri Lab Solutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile elde edilerek hesaplamalar yapıldı. Çoklu reaksiyon takip işlemi (MRM) modu analizi ölçmek için kullanıldı. Deneyde her bir bileşik analizi için iki veya üç kez uygulama yapıldı. Birinci kantitatif sonuçlar için ikinci ve üçüncü analizler ise teyit için yapıldı. Optimum ESI parametreleri; 350°C ara yüz sıcaklığı, 250°C DL sıcaklığı, 400°C ısı bloğu sıcaklığı, 3 L/dk. nebulizer gaz akışı (azot) ve 15 L/dk. kurutucu gaz akışı (azot) olarak belirlendi (Ertaş vd., 2015).

3. BULGULAR

Antioksidan özelliklere sahip yeni moleküllerin sentezi ve doğal antioksidan içeren bitkilerin tespiti çalışmaları son yıllarda çok sayıda bilimsel çalışmanın konusu olmuş ve sonuçları itibari ile yüksek yaygın etkiye sahip olmuştur. Gıda ve tıbbi amaçlı olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşiklerin içerik analizleri de antioksidan aktivite ile ilişkili olması açısından yaygın bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında DPPH[•] ve ABTS^{•+} radikal giderme aktiviteleri, FRAP metoduna göre ferrik iyonları indirgeme kapasite tayini, CUPRAC metoduna göre kuprik iyonları indirgeme kapasite tayini ve ferrik tiyosiyanat metoduna linoleik asit peroksidasyonu tayini metotları yapılmıştır. Bulgular BHA, BHT ve askorbik asit gibi standart olarak kabul edilen antioksidan maddeler ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca LC/MS-MS yöntemi ile bitki numunemizin fenolik içerik analizi yapılmıştır.

3.1. ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi Çalışma Bulguları

ABTS^{•+} giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstrelerin veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Bursal vd., 2013). Ekstreler ile çalışmada kullanılan askorbik asit, BHA ve BHT gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri çeşitli konsantrasyonlarda (10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml) çalışıldı.



Şekil 3.1. Ekstrelerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS^{•+} giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması

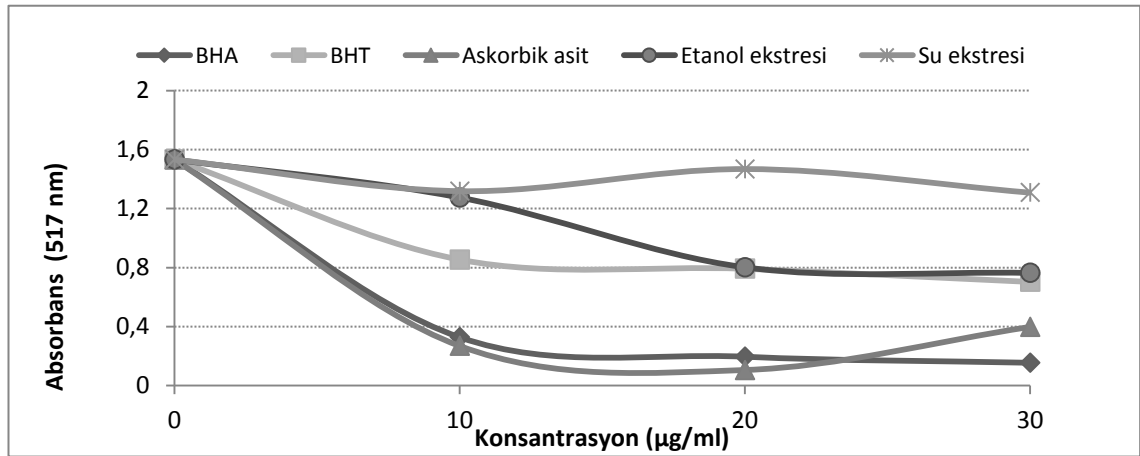
Ekstrelerin ve standart antioksidanların ABTS^{•+} gidermeleri ile ilgili hesaplamaları aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}}\right) \times 100$$

Ekstrelerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri standart birer antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. Ekstreler ile standart antioksidanlar 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla BHA \cong BHT > askorbik asit > etanol ekstresi > su ekstresi şeklinde ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi sergilediği belirlenmiştir. Bu değerler yine sırasıyla %94.8 \cong %94.7 > %73 > %32 > %15 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre etanol ekstresi önemli miktarda ABTS^{•+} radikali giderdiği ve su ekstresinin yaklaşık iki katı seviyesinde giderdiği bulunmuştur. Bu sonuçlara göre çalışma bitkimizin doğal antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 3.1).

3.2. DPPH[•] Serbest Radikali Giderme Aktivitesi ile İlgili Çalışma Bulguları

DPPH[•] radikali 517 nm’de ışığı maximum absorblama özelliğine sahiptir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda 517 nm’de azalan absorbans giderilen DPPH[•] radikali miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir. Çalışmada kullanılan *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. su ve etanol ekstralarının de standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve askorbik asit gibi etkili DPPH[•] serbest radikali giderme aktivitesinin olduğu Şekil 3.2’deki azalan absorbans eğiminden anlaşılmaktadır (Bursal, 2013).



Şekil 3.2. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) DPPH[•] radikali giderme aktivitelerinin karşılaştırması

DPPH• radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı. Burada A_{Numune} DPPH• radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra spektrofotometrede ölçülen absorbans değerini, $A_{Kontrol}$ ise sadece DPPH• radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT ve askorbik asit kullanıldı.

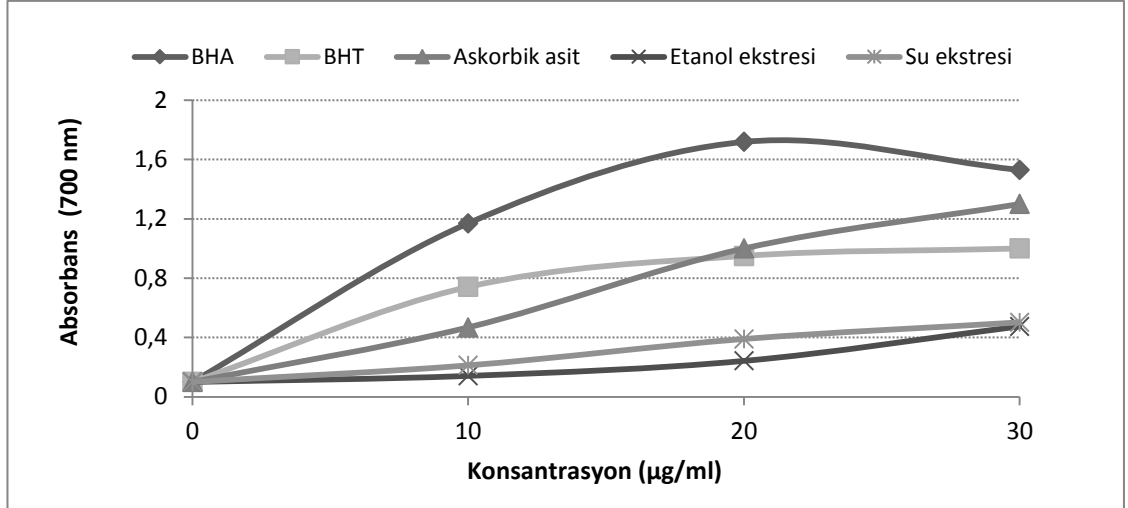
$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{Numune}}{A_{Kontrol}} \right) \times 100$$

Ekstreler ile standart antioksidanların 30 µg/ml konsantrasyonlarında DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla BHA > askorbik asit > BHT > etanol ekstresi > su ekstresi şeklinde sergilediği belirlenmiştir. Bu değerler yine sırasıyla %89.9 > %74.0 > %54.1 > %50.1 > %14.6 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre etanol ekstresi, su ekstresinin yaklaşık üç katı seviyesinde DPPH• radikali giderdiği bulunmuştur. Çalışma verilerine göre etanol ekstresi önemli miktarda %50'ye yakın oranda serbest radikal gideren doğal antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 3.2).

3.3. FRAP Metodu ile İlgili Çalışma Bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu yöntemde, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı yeşilin farklı tonlarına dönüşmektedir (Bursal, 2009). Renk koyulaşmasının ölçülmesi ile artan absorbans antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu gösterir.

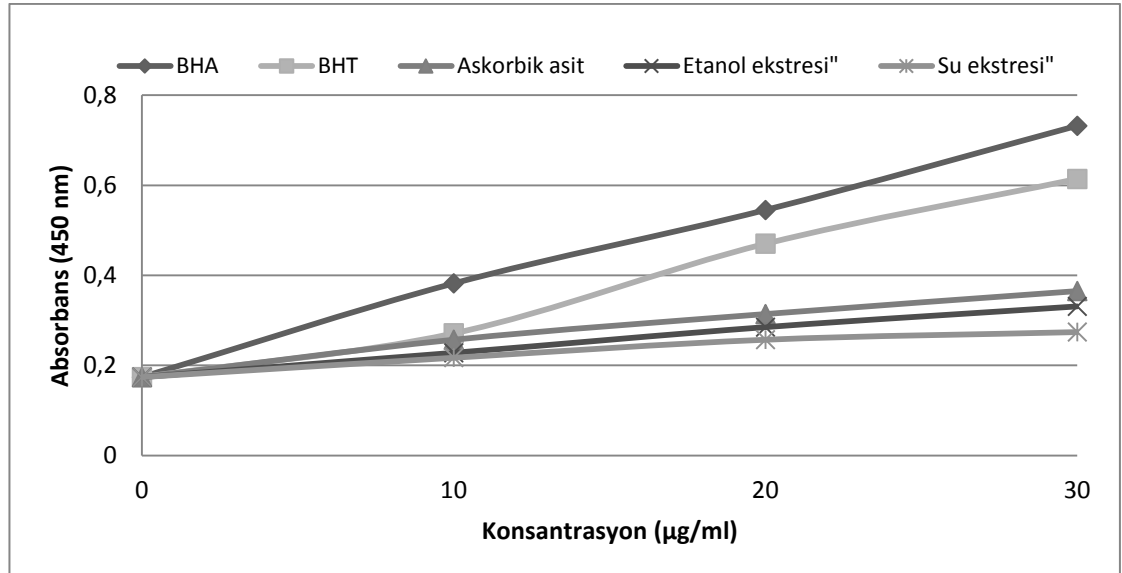
Çalışmada kullanılan su ve etanol ekstrelerinin indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar gibi artan ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Fakat bu artmanın standart antioksidanlar kadar belirgin ve anlamlı olmadığı Şekil 3.3'ten anlaşılmaktadır. Ekstrelerin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) FRAP metodu ile indirgeme kuvvetlerinin karşılaştırması

3.4. CUPRAC Metodu ile İlgili Çalışma Bulguları

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. liyofilize su ekstresinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, farklı konsantrasyonlarda (10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml) ekstre ihtiva eden numunelerin 450 nm'de absorbansları ölçülerek hesaplandı. Bitki ekstresinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi kontrollerde kullandığımız standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması Şekil 3.4'te gösterildi.

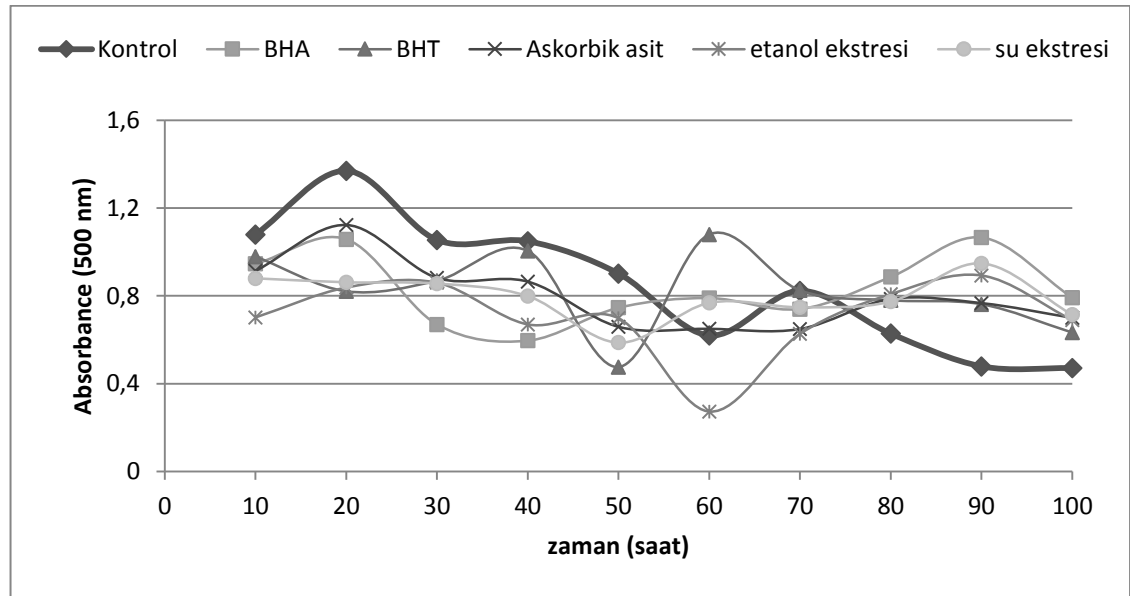


Şekil 3.4. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}), kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

Bulgulardan da anlaşıldığı gibi su ekstresi, etanol ekstresi ve askorbit asit birbirlerine yakın seviyelerde indirgeme kapasitesi sergilemiştir. 30 µg/ml konsantrasyonunda kuprik iyonlarını (Cu^{2+}), kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitelerinin sıralaması BHA > BHT > askorbik asit > etanol ekstresi > su ekstresi şeklindedir.

3.5. Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Bulguları

Çalışmada kullandığımız *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinden temin edilen su ve etanol ekstralarının antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat aktivite tayin metoduna göre belirlendi. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. elde edilen su ve etanol ekstralarının toplam antioksidan aktivite tayini için sırasıyla 20 µg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Şekil 3.5'te *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi grafiği verilmiştir.



Şekil 3.5. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. ekstralarının 20 µg/ml farklı konsantrasyonlardaki ferrik tiyosiyanat aktivite tayin metoduna göre toplam antioksidan aktivite standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

3.6. LC-MS/MS ile Fenolik İçerik Analizi

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinin fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi LC-MS/MS analiz metoduna göre yapıldı. Standart olarak alınan 27 farklı fenolik bileşiğin LC-MS/MS parametreleri ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Standart olarak alınan fenolik bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri

No	Analytes	RT ^a	Parent ion (m/z) ^b	Ionization Mode	R ^{2c}	RSD % ^d	Linearity Range (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Recovery (%)	U ^f
1	Quinic acid	3.32	190.95	Neg	0.9927	0.0388	250-10000	22.3 / 74.5	103.3	4.8
2	Malic acid	3.54	133.05	Neg	0.9975	0.1214	250-10000	19.2 / 64.1	101.4	5.3
3	tr-Aconitic acid	4.13	172.85	Neg	0.9933	0.3908	250-10000	15.6 / 51.9	102.8	4.9
4	Gallic acid	4.29	169.05	Neg	0.9901	0.4734	25-1000	4.8 / 15.9	102.3	5.1
5	Chlorogenic acid	5.43	353	Neg	0.9932	0.1882	250-10000	7.3 / 24.3	99.7	4.9
6	Protocatechuic acid	5.63	152.95	Neg	0.9991	0.5958	100-4000	25.8 / 85.9	100.2	5.1
7	Tannic acid	6.46	182.95	Neg	0.9955	0.9075	100-4000	10.2 / 34.2	97.8	5.1
8	tr- caffeic acid	7.37	178.95	Neg	0.9942	1.0080	25-1000	4.4 / 14.7	98.6	5.2
9	Vanillin	8.77	151.05	Neg	0.9995	0.4094	250-10000	10.1 / 33.7	99.2	4.9
10	p-Coumaric acid	9.53	162.95	Neg	0.9909	1.1358	100-4000	15.2 / 50.8	98.4	5.1
11	Rosmarinic acid	9.57	358.9	Neg	0.9992	0.5220	250-10000	10.4 / 34.8	101.7	4.9
12	Rutin	10.18	609.1	Neg	0.9971	0.8146	250-10000	17.0 / 56.6	102.2	5.0
13	Hesperidin	9.69	611.1	Poz	0.9973	0.1363	250-10000	21.6 / 71.9	100.2	4.9
14	Hyperoside	10.43	463.1	Neg	0.9549	0.2135	100-4000	12.4 / 41.4	98.5	4.9
15	4-OH Benzoic acid	11.72	136.95	Neg	0.9925	1.4013	25-1000	3.0 / 10.0	106.2	5.2
16	Salicylic acid	11.72	136.95	Neg	0.9904	0.6619	25-1000	4 / 13.3	106.2	5.0
17	Myricetin	11.94	317	Neg	0.9991	2.8247	100-4000	9.9 / 32.9	106.0	5.9
18	Fisetin	12.61	284.95	Neg	0.9988	2.4262	100-4000	10.7 / 35.6	96.9	5.5
19	Coumarin	12.52	146.95	Poz	0.9924	0.4203	100-4000	9.1 / 30.4	104.4	4.9
20	Quercetin	14.48	300.9	Neg	0.9995	4.3149	25-1000	2.0 / 6.8	98.9	7.1
21	Naringenin	14.66	270.95	Neg	0.9956	2.0200	25-1000	2.6 / 8.8	97.0	5.5
22	Hesperetin	15.29	300.95	Neg	0.9961	1.0164	25-1000	3.3/ 11.0	102.4	5.3
23	Luteolin	15.43	284.95	Neg	0.9992	3.9487	25-1000	5.8 / 19.4	105.4	6.9
24	Kaempferol	15.43	284.95	Neg	0.9917	0.5885	25-1000	2.0 / 6.6	99.1	5.2
25	Apigenin	17.31	268.95	Neg	0.9954	0.6782	25-1000	0.1 / 0.3	98.9	5.3
26	Rhamnetin	18.94	314.95	Neg	0.9994	2.5678	25-1000	0.2 / 0.7	100.8	6.1
27	Chrysin	21.18	253	Neg	0.9965	1.5530	25-1000	0.05 / 0.17	102.2	5.3

^aRT: Tutma süresi

^bParent ion (m/z): Moleküler iyonların standart bileşikleri

^cR²: Determinasyon katsayısı

^dRSD: Bağlı standart sapma

^eLOD/LOQ (µg/L): Nicelik algılama/ sınır sınırı

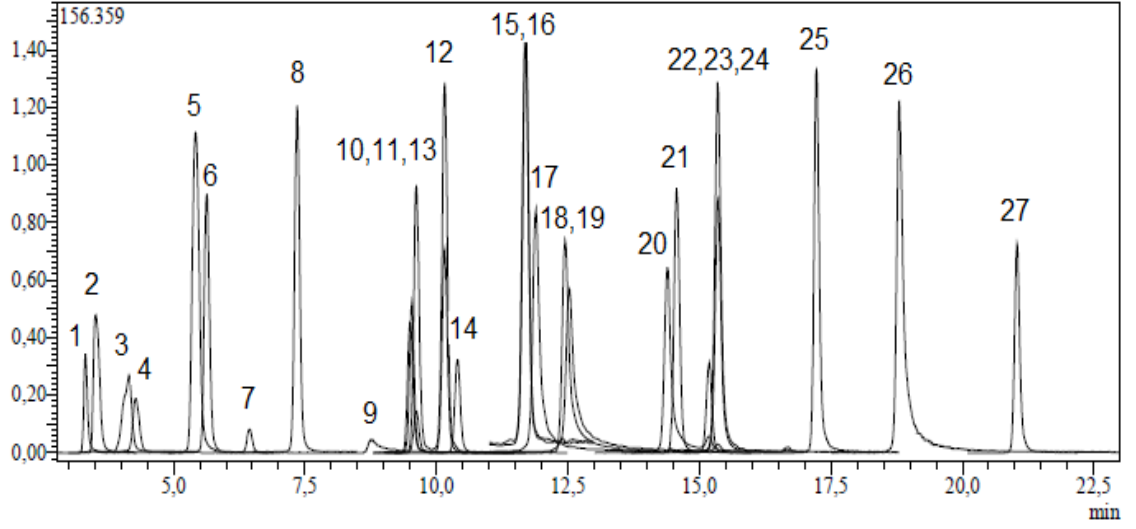
^fU (%): % 95 güven düzeyinde (k = 2) de yüzde bağlı belirsizlik.

^g Bitki metanol özü µg/g değerleri (w/w)

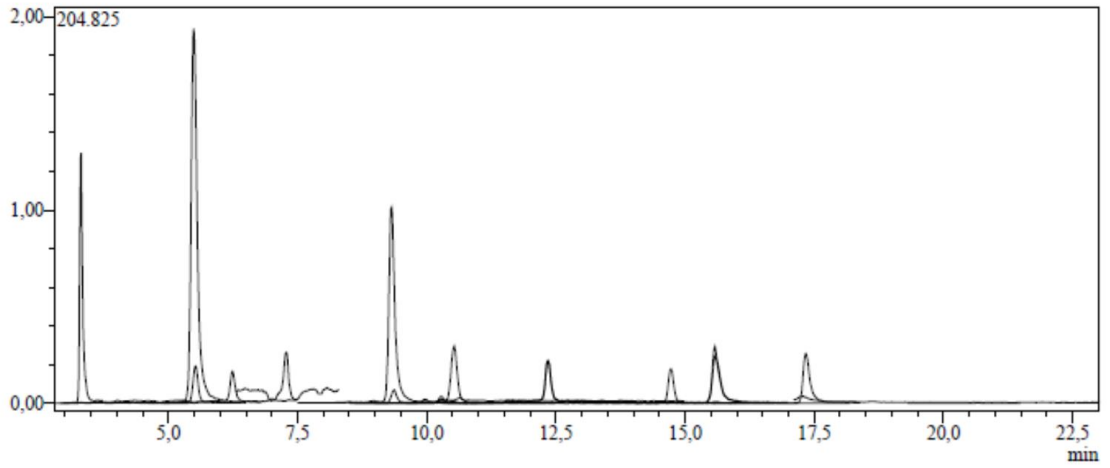
^hN.D: Algılanmadı.

Stachys lavandulifolia Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisine ait etanol ekstratların fenolik içeriklerinin analizi için kullanılan bileşiklere ait kromatogramlar

Şekil 3.6’ da verilmektedir. Aynı yöntem kullanılarak numunemizden hazırlanan bitki ekstresi cihaza verilmiş ve Şekil 3.7’deki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 3.6. UHPLC-ESI-MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin kalibrasyon kromatogramları



Şekil 3.7. UHPLC-ESI-MS/MS ile *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. ekstresinin kromatogramları

UHPLC-ESI-MS/MS ile yapılan çalışmanın kantitatif olarak verileri de kullanılan standartlardan faydalanarak hesaplanmış ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisi fenolik bileşiklerinin kantitatif sonuçları

Konsantrasyon (ppb)		
No	Bileşik	Miktarı (ppb)
1	Quinic acid (Kuink asit)	2534±122
2	Chlorogenic acid (klorojenik asit)	1882±92
3	Hyperoside (Hiperosit)	170±8
4	Protocatechuic acid (Protokateşik asit)	117±6
5	p-Coumaric acid (p-kumarik asit)	112±6
6	Kaempferol	49±3
7	Apigenin	36±2
8	tr-caffeic acid (kafeik asit)	32±2
9	Rutin	23±1
10	Naringenin	22±1
11	4-OH-benzoic acid (4-OH-benzoik asit)	17±1
12	Salicylic acid (Salisilik asit)	16±1

Çizelge 3.2’ den anlaşıldığı gibi bitki yapısında standart olarak kullandığımız 27 fenolik bileşik içerisinde en fazla kuink asit (quinic acid), klorojenik asit (chlorogenic acid), hiperosit (hyperoside) ve protokateşik asit (protocatechuic acid) fenolik bileşikleri tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte, çevre kirliliği, sigara, alkol, sentetik ilaçların kullanım sıklığı, ultraviyole (UV) ışınlar vb. birçok faktör insanların, çeşitli zararlı durumlarla karşılaşmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra çevresel ve psikolojik durumlardan dolayı oluşan stres serbest radikallerin oluşmasına olanak sağlamaktadır. Serbest radikallerin oluşumu çeşitli zararlı hastalıkların oluşmasını da beraberinde getirmekte bu durum insan sağlığını olumsuz yönde etki etmektedir. Oluşan hastalıklara önlemede öncelikli amaç koruyucu hekimlik olarak isimlendirilen bu hastalıkların oluşmasına engel olmakla sağlanabilir. Hastalığın engellenmesinde bitkisel gıdalar, sentetik maddelere göre daha güvenilir hale gelmektedir. Doğal antioksidanlar bu amaçla giderek önem kazanmakta ve insan sağlığına olumlu etkileri araştırılmaktadır (Benzie, 2003; Öğüt, 2014).

Doğal bir antioksidan kaynağı olan bitkilerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar son zamanlarda yaygın bir şekilde artış göstermektedir. Özellikle alternatif tıpta kullanılan bitki türleri ile gıda alanında kullanılan bazı bitki türleri antioksidan çalışmaların odak noktasını teşkil etmektedir. İnsan sağlığına yararlı bitkiler, içerdikleri fenolik bileşikler sayesinde hastalık tedavisinde kullanılmaktadır (Zaidan, 2005).

Stachys lavandulifolia türü ülkemizde yaprak ve çiçekli dalları “dağ çayı” adı ile bilinmekte halk arasında çay ve halk ilacı olarak kullanılmaktadır. *Stachys lavandulifolia* türü çok yıllık yarı çalimsı ve tabanında rozet steril kökleri içeren, çiçekli gövdeleri çok sayıda, 10-30 cm boyunda, korollası genelde pembe renkli, 5-8. Ayalarda çiçeklenebilen ve genellikle kalkerli kayalık-taşlık alanlarda ve çalılıklarda yayılış gösterir. *Stachys lavandulifolia* türünün ülkemizde 3 varyetesi olup, (*var. brachyodon*, *var. glabrescens*, *var. lavandulifolia*), bu çalışmada *var. brachyodon* ile çalışılmış ve bu varyete diğerlerinden kaliks uzunluğu ve yapraklarının yapısıyla ayrılmaktadır (Davis, 1982).

Stachys lavandulifolia Vahl. *var. brachydon* Boiss. ile ilgili antioksidan etkileri değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmalar çok az miktardadır. *Stachys lavandulifolia* Vahl. *var. brachydon* Boiss. bitkisinin kurutulmuş yaprak ve çiçekleri antioksidan aktivite yönünden incelenmiştir. Bitkilerin etkili bileşiklerinin aktivitesi, bitkinin

toplanma zamanı, kurutulması ve depolanması sırasında uygulanan işlemlere göre değişkenlik gösterebilmektedir (Baytop, 1999).

Çalışmamızda *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisi etanol ve su ekstraktları hazırlanmıştır. Bu çalışmada, ekstre hazırlanırken kurutma ve depolama kurallarına uyulduğu için ekstrenin biyolojik aktivitesinin korunduğu düşünülmüştür. Yapılan literatür taramalarında *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. kimyasal içeriği ve biyolojik etkinliğinin araştırıldığı çok az çalışmaya rastlanmıştır.

Bitkilerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde doğru yöntemi seçmek önemlidir. Antioksidanın su veya yağda çözünbilme özelliğinin olmasından dolayı doğru yöntemi seçmek önemlidir. Antioksidandaki çözünbilme özelliğinden dolayı hidrofilik ve lipofilik olarak sınıflandırılmaktadır.

Doğal bir antioksidan kaynağının her bir bileşeninin saflaştırılarak ve tek başına tayin edilmesi hem pahalı hem de uzun süren analizlerdir. Bir karışımdaki antioksidan bileşiklerin birbirleri arasındaki ilişkiler de dikkate alındığında total antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemler önem kazanmaktadır.

Tıp, gıda ve eczacılıkta serbest radikallerinin insan sağlığına olan zararlı etkilerini gidermek açısından doğal antioksidan kaynakları tespiti çok önem kazanmaktadır. Serbest radikallerin etkilerinin giderek artması eczacılık ve gıda sektöründe lipid peroksidasyonunu arttırmakta ve ürün kalitesi giderek azalmaktadır. Farmasotik değerinin ön plana çıkarılması, antioksidan aktivitesinin belirlenerek terapik potansiyelinin tespit edilerek doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Bitkilerin antioksidan özelliklerinin tespiti büyük öneme sahiptir. Özellikle gıda, farmakoloji ve tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin aktif bileşenlerinin kapasitelerinin belirlenmesinde yapılan çalışmalar giderek yaygın hale gelmiştir. Yapılan çalışmalarda antioksidanlar ve serbest radikallerin giderilmesiyle ilgili çalışmalar giderek artmakta ve buna bağlı olarak yeni metotlar geliştirilmektedir. Bu metotlardan en sık kullanılanların başında total indirgenme kapasitesi, DPPH radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺ giderme aktivitesi, DMPD⁺ giderme aktivitesi, PMS-NADH-NBT sistemi, ksantin-ksantinoksidaz sistemi ve riboflavin-metiyonin-ışık sistemi gibi sistemlerde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi radikal giderme metotları kullanılmaktadır (Gülçin, 2006). Bu antioksidan tayin yöntemleri kolay kullanımı,

hassaslık, analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği ve ekonomik avantajlarından dolayı sürekli kullanılmaktadır (Bursal, 2009).

DPPH serbest radikali mavi renk tonunda olan 517 nm'de absorbans veren organik yapıda olan bir maddedir. Bu radikal madde antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek, radikal olmayan DPPH-H molekülüne dönüşmektedir. DPPH-H molekülü 517 nm'de absorbans vermediği için azalan absorbans miktarından antioksidan aktivite hesaplanabilir. Ekstreler ile standart antioksidanlar DPPH• radikali giderme yüzdeleri belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre etanol ekstresi (%50.1) ve su ekstresi (%14.6) serbest radikal gideren doğal antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur.

ABTS metodu bitki ekstralarının, etanol ekstresi ve su ekstresi standart birer antioksidan olan BHA, BHT ve Askorbik asit ile karşılaştırılması sonucu; 30 µg/ml konsantrasyonunda BHA > BHT > askorbik asit > etanol ekstresi > su ekstresi şeklinde ABTS^{•+} giderme aktivitesi gösterdikleri görülmüştür. Etanol ekstresi ve su ekstresi sırasıyla %32 ve %15 düzeylerinde ABTS radikali giderdiği hesaplanmıştır.

Çalışma verilerine göre hem DPPH, hem de ABTS metotlarında benzer oranlar ve sıralamalar gözlemlenmiştir. Etanol ekstresi, su ekstresine göre çok daha yüksek miktarlarda her iki radikali de giderdiği bulunmuş olup bu durum çözücü farkına göre etanol de daha iyi aktivite elde edilmesini sağlamıştır.

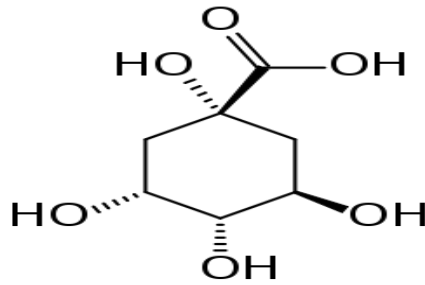
Total indirgenme kapasitesi metodu (FRAP Metodu), indirgeme kapasitesi tayininde *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. bitkisinin ekstralarının ferik iyonları (Fe⁺³) ferröz iyonlarına (Fe⁺²) dönüştürebilmesine incelenmiştir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve antioksidan aktivite potansiyelini belirleyen önemli bir gösterge olarak kabul edilir. Oksidan maddeleri indirgeyerek bunların zararlı etkilerini inhibe ederler. Çalışmada kullanılan su ve etanol ekstralarının indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve askorbik asit kadar belirgin ve anlamlı olmadığı ancak orta düzeyde olduğu anlaşılmaktadır.

CUPRAC metoduna göre *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. yaprakları etanol ekstralarının kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi ekstraların artan konsantrasyonu ile artmıştır. Etanol ekstralarının indirgeme gücü standart antioksidan bileşiklerden az olmakla birlikte, su ve etanol ekstresinin indirgeme

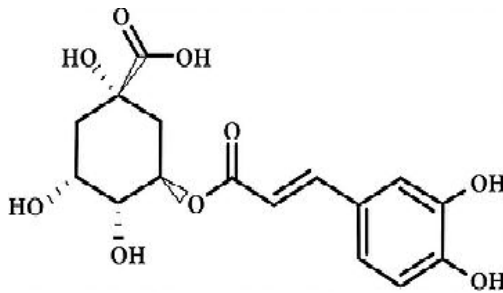
gücünün askorbik asite yakın olduğu ve dolayısıyla antioksidan özelliğinin yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Linoleik asit peroksidasyonu metodu; bitki ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi çalışıldı ve standart antioksidanlar (BHT, BHA ve C vitamini) ile karşılaştırıldı. Ekstrelerin 20 µg/ml konsantrasyonunda lipit peroksidasyon inhibisyonunda da artış gözlemlendi. Genel olarak ekstrerin standart antioksidanlara benzer linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonunda önemli derecede antioksidan aktiviteler gösterdiği tespit edildi.

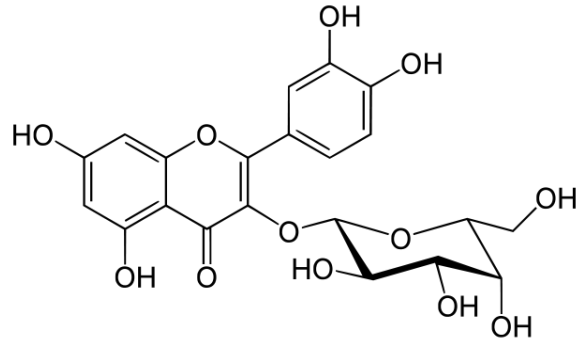
LC/MS-MS analiz sonuçlarına göre fenolik içerik analizi yapılmıştır. En fazla kuinik asit (quinic acid), klorojenik asit (chlorogenic acid), hiperosit (hyperoside) ve protokateşik asit (protocatechuic acid) bileşikler tespit edilmiştir.



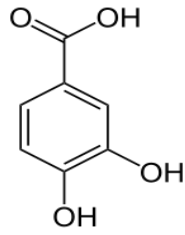
1. Kuinik asit



2. Klorojenik asit



3. Hiperosit



4. Protokateşik asit

Bu bileşiklerin kimyasal yapıları polifenolik yapıdadır. Bu kimyasal yapılarında bulunan aromatik halkalardaki fenol gruplarından dolayı elektron vererek radikalleri gidermesinden dolayı antioksidan özellikler göstermiştir. Bu bileşiklerin ortak özelliği olan çok sayıda hidroksil OH içermeleri bitkinin toplam antioksidan düzeyini artıran önemli bir etkendir.

KAYNAKLAR

Akçiçek, E., Dirmenci, T., Dündar, E., 2012. Taxonomical notes on *Stachys section. Eriostomum* (Lamiaceae) in Balıkesir Turkey, 36: 217-234

Akkuş, İ., 1995. Serbest oksijen radikalleri ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya.

Akyüz, E., 2007. *Polygonum bistorta ssp. Carneum* bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.

Altop, A., Erener, G., 2009. kanatlılarda serbest radikal oluşumu, lipit oksidasyonu ve antioksidanlar arasındaki ilişkiler. V. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi (Uluslararası katılımlı), Çorlu-Tekirdağ

Altınışık, M., 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.

Altun, D., Ayar, A., Uysal, H., Kara A.A., Ünal, E.L., 2010. Extended longevity of *Drosophila melanogaster* by water and ethanol extracts of *Stachys lavandulifolia*. *Pharmaceutical Biology*, 48, 1291-1296.

Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, S., 2006. *Diabetes Mellitus* and oxidative stress, *Türk Biyokimya Dergisi*, 31 (2), 51-56.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Proceedings of the National Academy of Sciences September 1; 90(17), 7915-7922.

Asad, N.R., Asad, L.M.B.O., Bonacossa de Almeida, C.E., Felzenszwalb, I., Cabral-Neto, J.B., Leitao, A.C., 2004. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the E. coli genome. *Genetics and Molecular Biology*, 27 (2), 291-303.

Aslan, R., 1999. Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 12(8), 475-480.

Arıdur, R., Arabacı, G., 2013. Ciğertaze otu (*Salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 17, 241-246.

Aydemir, B., Karadağ Sarı, E., 2009. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.

Basta, A., Haenen, G., Goelmen, J. A., 1991. Oxidants and antioxidants. State of the Art the *American Journal of Medicine*, 91 (3), 2-13.

Baştürk, K., Dinç, M., Doğu, S., 2015. Anatomical characteristics of Turkish endemic *Stachys rupestris* Montbret et Aucher ex Bentham (Lamiaceae). *Modern Phytomorphology*, 8, 37-40.

Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. 2.baskı, Nobel Yayınları, ss 3-210.

Benzie, I.F.F., 2003. Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 136, 113-126

Biçim, G., 2013. Oksidatif stres ve antioksidan kapasite ile ilişkili gen polimorfizimlerinin değişik yöntemlerle belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44 (5), 1482-1489.

Bursal, E., 2013. Kinetic properties of peroxidase enzyme from chard (*Beta vulgaris subspecies cicla*). *International Journal of Food Properties*, 16 (6), 1293-1303.

Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C., 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. *Food Research International*, 51, 66-74.

Cochrone, G.G., 1991. Cellular injury by oxidans. *The American Journal of Medicine*, 91 (Suppl. 3C), 23-30.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb Journal*, 17, 1195-214.

Çaylak, E., 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1), 73-83.

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

Davis, P. H., 1982. *Flora of Turkey and the East Aegeans*, Edinburg University Press, Edinburg.

Doğmuş, D., Durucasu, İ., 2013. Keten tohumu çeşitlerinin n-bütanol fraksiyonlarının fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 9 (1), 47-56.

Dündar, E., Akçiçek, E., Dirmenci, T., Akgün, Ş., 2013. Phylogenetic analysis of the genus *Stachys* Sect. *Eriostomum* (Lamiaceae) in Turkey based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences. Turkish Journal of Botany, 37, 14-23.

Erbaş, D., 1993. Radikal kavramı ve oksijen radikalleri, Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu: Oksidan stres ve hücre hasarı kurs notları. ss: 1-5.

Erdoğan, E. A., Everest, A., De Martino, L., Mancini, E., Festa, M., De Feo, V., 2013. Chemical composition and *in vitro* cytotoxic activity of the essential oils of *Stachys rupestris* and *Salvia heldreichiana*, Two Endemic Plants of Turkey, Natural Product Communications 8 (11), 1637-1640.

Erenel, G., Erbaş, D. ve Arıcıoğlu, A., 1992. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. Gazi Tıp Dergisi, 3, 243-250.

Ertaş, A., Boğa, M., Yılmaz, M.A., Yeşil, Y., Tel, G., Temel, H., Haşimi, N., Gazioğlu, I., Öztürk, M., Uğurlu, P., 2015. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. Industrial Crops Products, 67, 336-345.

Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* arn. subsp. *palisiana* (Lamb.) Holmboe, Journal Ethnopharmacol, 86: 51-58

Gülçin, İ., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 217, 213-220.

Gülçin, İ., Topal, F., Öztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., Bilsel, G., Gören, A.C., 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). Records of Natural Products, 5(3), 158-175.

Hajhashemi, V., Ghanndi, A., Sedighifar, S., 2007. Analgesic and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic, poly phenolic and boiled extracts of *Stachy slavandulifolia*. Research in Pharmaceutical Sciences, 2, 92-98.

Hasler, C.M., 2000. Plants as medicine: The role of phytochemicals in optimal health. In Phytochemicals and Phytopharmaceuticals, edited by F. Shahidi and C.-T. Ho, pp. 1-12. Champaign, Illinois: AOAC Press.

Haznagy-Radnai, E., Czige, S., Zupkó, I., Falkay, G., Máthe, I., 2006. Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia*; 77(7-8), 521-524.

İşbilir, Ş.S., 2008. Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne.

İşcan, G., Köse ,Y.B., Demirci, B., 2015. *Stachys rupestris* (Lamiaceae)'in uçucu yağ bileşimi ve antimikrobiyal etkileri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C-Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, Eskişehir, 4, 41-47.

Jacobson, J.M., Michael, J.R., Jafri M, Gurtner, G.T., 1993. Antioxidants and antioxidant enzymes protects against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *American Physiological Society*, 68(3):1252-9

Johnson, B.C., Kirby, J., Naxakis, G., Pearson, S., 1999. Substantial UV-B-Mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum Basilicum* L.). *Phytochemistry*, 51:507-510.

Jung, K.A., Song, T.C., Han, D.S., Kim, I.H., Kim, Y.E., Lee, C.H., 2005. Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1782-1785.

Kanbak, G., 1994. P-Aminofenol toksisitesinde serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizmalarının rolü. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

Karaman, Ş., 2008. Türkiye'de yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan özellik gösteren başlıca bileşenlerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum.

Koç, E., Üstün, A.S., 2008. Bitkilerde protein kinazların rolü. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20, 25-34.

Langseth, L., 1995. *Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention*. ILSI Europe, Belgium.

Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K., 1996. *Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives*, Markel Dekker, New York.

Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-370.

Morteza, S.K., Saeedi, M., Shahani, S., 2006. Antioxidant activity of the methanolic extracts of some species of *Phlomis* and *Stachys* on sunflower oil. *African Journals Online*, 5(24): 2428-2432.

Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. and Vercesi, A.E., 2002. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymology*, 348, 260-270.

Nichenametla, S.N., Taruscio T.G, Barney D.L, Exon J.H., 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics In cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 161-183.

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

Öğüt, S., 2014. Doğal antioksidanların önemi, *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty*, 11(1), 25-30.

Özdemir, G., 1993. Reaktif oksijen partikülleri (ROP) (Oksidan molekülleri serbest radikaller), *Roche Bilimsel Eserler Serisi*, Van.

Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60 (Suppl 2): 12-22.

Piozzi, F., Bruno, M., 2011. Diterpenoids from roots and aerial Parts of the genus *Stachys*, *Records of Natural Products*, 5(1), 1-11.

Radulovic, N., Lazarevic, J., Ristic, N., Palic, R., 2007. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* Species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 196-208.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Sayan, H., Çetin, E., Yarım, İ., Gönül, B., 2000. Yüksek irtifada antreman yapan kayakçılarda C Vitamini Eritrosit Süperoksid dismutaz Enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu düzeyleri üzerine etkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 20: 5-10.

Shacter, E., 2000. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 319, 428-436.

Sies, H., 1991. Oksidants and antioxidants: *Pathophysiology*, 91(3), 31-38.

Silinsin, M. 2016. *Inula graveolens* L. bitki türüne ait su ve etanol ekstrahlarının antioksidan aktivitelerinin değişik *in vitro* metotlar ile belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muş Alparslan Üniversitesi, Muş.

Steinberg, D., 1991. Antioxidants and aterosklerozis. acurrent assesment, circulation. 84 (3), 1420-1425.

Stevenson, D.E., Hurst, R.D., 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more. Cellular and Molecular Life Sciences, 64, 2900-2916.

Şerbetçi, T., Özsoy, N., Demirci, B., Can, A., Kültür, Ş., Baser, K.H.C., 2012. Chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of methanolic extracts from fruits and flowers of *Hypericum lydiium* Boiss. Industrial Crops and Products, 36, 599-606.

Şerbetçi, T., Demirci, B., Güzel, C.B., Kültür, S., Ergüven, M., Başer, K.H.C., 2010. Essential oil composition, antimicrobial and cytotoxic activities of two endemic *Stachys cretica* subspecies (Lamiaceae) from Turkey. Natural Product Communications, 5, 1369-1374.

Tozoğlu, F. 2011. Erzincan kirazı (*Cerasus erzincanica*) sap ve tohum kısımlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan Üniversitesi, Erzincan.

Ugur, A., Sarac, N., Varol, O., 2013. Antimicrobial activities of the essential oils of endemic *Stachys rupestris* and *Stachys amanica* against multi-resistant bacteria, Indian Journal of Pharmacology 45(2), 201-202.

Uysal, M., 1998. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmadaki prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim, 11, 336-341.

Wang, S.P., Leong, L.P. and Koh, J.H.W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry, 99, 775-783.

Yavuzer, S., Nalçacı, E., Akbay, C., Yardımcı, S., Ocakçioğlu, B., Baştuğ, M., Yavuzer, Ş., 1991. Oksidan stres ve akciğerler solunum, 14, 181-189.

Yeloğlu, İ., 2012. Karayosunlarının antioksidan aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Eczacılık Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Yılmaz, İ., 2010. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 17(2), 143-153.

Zaidan, M.R.S., Noor, R.A., Badrul, A.R., Adlin, A., Norazah, A., 2005. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method, Tropical Biomedicine, 22(2), 165-170.

Zulueta, A., Esteu, M.J., Frasquet, I., 2007. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skin milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*,103, 1365-1374.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Muş'ta doğdu. İlköğrenimini, orta ve lise öğrenimini Muş'ta tamamladı. Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.