

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

Muzaffer SİLİNSİN

***Inula graveolens* (L.) Desf. BİTKİ TÜRÜNE AİT SU VE ETANOL
EKSTRELERİNİN ANTiOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞİŞİK IN
VITRO METOTLAR İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUŞ-2016

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

Muzaffer SİLİNSİN

***Inula graveolens* (L.) Desf. BİTKİ TÜRÜNE AİT SU VE ETANOL
EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN 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 “*Inula graveolens* (L.) Desf. Türüne Ait Su ve Etanol Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitelerin Değişik In Vitro Metotlar İle Belirlenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt 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.

04/04/2016

Muzaffer SİLİNSİN

TEZ KABUL TUTANAĞI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Doç. Dr. Ercan BURSAL danışmanlığında, Muzaffer SİLİNSİN tarafından hazırlanan “*Inula graveolens* (L.) Desf. bitki türüne ait su ve etanol ekstratlarının antioksidan aktivitelerin değişik in vitro metotlar ile belirlenmesi” konulu bu çalışma 14/03/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza : 

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza : 

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

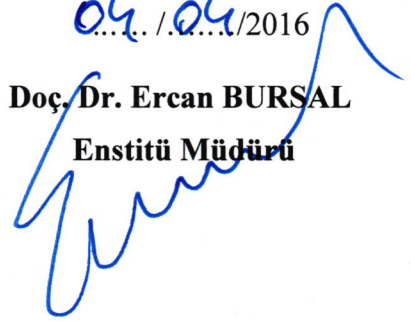
İmza : 

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine aittir.

04.04/2016

Doç. Dr. Ercan BURSAL

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği geçen, bu süreçte sabrını ve bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmalarımnda her türlü konuda destek olan, deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ercan BURSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma materyali olan bitkinin tetkik ve teşhisinde bana yardımcı olan Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer KILIÇ'a teşekkür ederim. Ayrıca tez yazım aşamasında her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen arkadaşım Nurettin TÜRKMEN ve Nimet YILMAZ'a teşekkür ederim. Yine, tez yazım aşamasında destek ve katkılarını esirgemeyen fedakar eşim ve çocuklarıma teşekkür ederim.

Muzaffer SİLİNSİN

Mart, 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>Inula</i> Cinsinin Özellikleri.....	1
1.2. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. Türü.....	2
1.3. Serbest Radikaller.....	4
1.3.1. Serbest radikallerin biyolojik etkileri.....	11
1.3.1.1. Proteinlere etkisi.....	11
1.3.1.2. Nükleik asitlere etkisi.....	11
1.3.1.3. Zar yapısındaki lipitlere etkisi.....	12
1.3.1.4. Sitolik moleküllere etkisi.....	13
1.3.1.5. Hücre dışı etkiler.....	13
1.4. Antioksidanlar.....	13
1.4.1. Endojen antioksidanlar.....	16
1.4.1.1. Enzimatik endojen antioksidanlar.....	17
1.4.1.2. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar.....	19
1.4.2. Eksojen antioksidanlar.....	19
1.4.2.1. α - tokoferol (E vitamini).....	20
1.4.2.2. β -karoten.....	20
1.4.2.3. Askorbik asit (vitamin C).....	20
1.4.2.4. Folik asit (folat).....	21
1.4.2.5. Fenolik bileşikler.....	21
2. MATERYAL VE METOT	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Kullanılan bitki materyali.....	23
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
2.1.3. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	23
2.2. Metot.....	24

2.2.1. Numunelerin su ekstralarının hazırlanması.....	24
2.2.2. Numunelerin etanol ekstralarının hazırlanması.....	24
2.2.3. DPPH• (1,1-difenil 2-pikril hidrazil) giderme aktivitesi.....	24
2.2.4. FRAP metoduna göre indirgeme kuvveti tayini.....	25
2.2.5. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini.....	25
2.2.6. LC-MS/MS ile fenolik içerik analizi.....	26
2.2.6.1. Test çözeltisi olan bitki ekstresinin hazırlanması.....	26
2.2.6.2. Cihazlar ve LC-MS/MS cihazı ve kromatografik koşullar.....	26
2.2.6.3. MS cihazlandırılması.....	26
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	27
3.1. DPPH• Serbest Radikali Giderme Aktivitesi ile İlgili Çalışma Bulguları.....	27
3.2. FRAP Metodu ile İndirgeme Kuvveti Çalışma Bulguları.....	28
3.3. Kuprak Metodu ile İndirgeme Kuvveti Çalışma Bulguları.....	29
3.4. LC-MS/MS ile Fenolik İçerik Analizi.....	31
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
5. KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Inula graveolens* (L.) Desf. BİTKİ TÜRÜNE AİT SU VE ETANOL EKSTRELERİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞİŞİK IN VITRO METOTLAR İLE BELİRLENMESİ**

Muzaffer SİLİNSİN

Tez Danışman: Doç. Dr. Ercan BURSAL

2016, 41 Sayfa

Canlı sistemlerde, hem ekzojen radikaller hem de metabolik sürecin bir parçası olan endojen radikaller pek çok metabolik bozukluklara neden olmaktadır. Vücudumuz, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin etkilerini tolere eden bir antioksidan sisteme sahiptir. Bu antioksidan sistem oksidanlar ile denge halindedir. Antioksidanlar ile radikallerin arasındaki dengenin bozulması sonucu oksidatif stres gelişir ve bu dengesizlik, önemli hücre yapılarında geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir. Antioksidan mekanizmalar serbest radikallerin zararlarını elimine ederler.

Bu çalışmanın temel amacı Türkiye’de yetişen *Inula graveolens* (L.) Desf. türünün yapraklarından elde edilen su ve etanol ekstralarının antioksidan miktarını belirlemektir. Ekstrelerin DPPH, CUPRAC ve FRAP metodlarına göre antioksidan aktiviteleri BHA, BHT ve askorbik asit gibi standart antioksidanlarla karşılaştırılarak hesaplandı.

Ayrıca, bitkide bulunan antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşiklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Fenolik içerik analizi için UHPLC-MS yöntemi kullanıldı. Çalışma sonuçlarına göre, polifenolik yapıda olan bileşiklerden en fazla klorojenik asit, kuinik asit, hiperosit ve protokateşik asit bileşikler tespit edilmiştir. *Inula graveolens* (L.) Desf. bitkisinin oksidasyon proseslerinde oluşan radikallerle mücadele eden antioksidan kapasitesi bitkide mevcut olan fenolik bileşiklerle bağlantılıdır.

Anahtar Kelimeler: Serbest radikaller, antioksidanlar, *Inula graveolens* (L.) Desf.

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF WATER AND ETHANOL EXTRACTS OF *Inula graveolens* (L.) Desf.

Muzaffer SILİNSİN

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ercan BURSAL

2016, Page: 41

Both exogenous radical processes and endogenous radicals that produced as part of a metabolic process lead to many metabolic disorders in living systems. Our bodies have antioxidant systems which tolerate the action of free radicals and reactive oxygen species. This antioxidant system is in equilibrium with oxidants. The imbalance between radicals and antioxidants can cause irreversible damage in essential cell structure that called oxidative stress. Antioxidant mechanisms eliminate the damage of free radicals.

The main purpose of this study is determining antioxidant activities of water and ethanol extracts that obtained from the leaves of *Inula graveolens* (L.) Desf. species grown in Turkey. Antioxidant activities of extracts were determined according to the DPPH, FRAP and CUPRAC methods and the results were compared with BHA, BHT and ascorbic acide which are used as standard antioxidants.

Also, phenolic composition of *Inula graveolens* (L.) Desf. determined by UHPLC-MS methods. According to the result, many polyphenolic compounds such as chlorogenic acid, quinic acid, hyperoside and protocatechuic acid were detected. The antioxidant capacity of *Inula graveolens* (L.) Desf. is associated with the presence of phenolic compounds, which react with the free radicals formed during the oxidation process

Keywords: Free radicals, antioxidants, *Inula graveolens* (L.) Desf.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge1.1. Serbest radikallerin sebep olduğu hastalıklar.....	6
Çizelge1.2. Serbest radikal kaynakları.....	7
Çizelge1.3. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri.....	9
Çizelge1.4. Antioksidan moleküller.....	16
Çizelge1.5. Endojen antioksidanlar.....	17
Çizelge1.6. Eksojen antioksidan ilaçların kullanımı.....	20
Çizelge1.7. Vitamin C, Vitamin E ve β -karotenin bazı hastalıklar üzerine etkisi.....	22
Çizelge 3.1. Standart olarak alınan fenolik bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri.....	30
Çizelge 3.2. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. bitkisi fenolik bileşiklerinin kantitatif sonuçları.....	32

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. bitki türü.....	3
Şekil 1.2. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu.....	8
Şekil 1.3. Antioksidanların hücresel etkileri.....	15
Şekil 3.1. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) DPPH [•] radikali giderme aktivitelerinin karşılaştırması	27
Şekil 3.2. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) FRAP metodu ile indirgeme kuvvetlerinin karşılaştırması	28
Şekil 3.3. <i>Inula graveolens</i> su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu ²⁺), kupröz iyonlarına (Cu ⁺) indirgeme kuvvetinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması.....	29
Şekil 3.4. UHPLC-ESI-MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin kalibrasyon kromatogramları.....	31
Şekil 3.5. UHPLC-ESI-MS/MS ile <i>Inula graveolens</i> ekstresinin kromatogramları.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde Değer
⁰ C	: Santigrat derece
•	: Radikal
A	: Alfa
dk	: Dakika
M	: Molar
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar

Kısaltmalar

ABTS	: 2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit radikali
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	: Bütillenmiş Hidroksianisol
FRAP	: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
CUPRAC	: Cupric Reducing Antioxidant Capacity
CAT	: Katalaz
DPPH•	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Reaktif Azot Türleri
R•	: Organik Radikali
ROO•	: Peroksit Radikali
RO•	: Alkoksi Radikali
RS•	: Tiyil Radikali
RSO•	: Sülfenil Radikali
OH•	: Hidroksi Radikali
POD	: Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GSSG-Rx	: Glutasyon Redüktaz
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit Radikali
SOD	: Süperoksit Dismutaz
MDA	: Malondialdehit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
LDL	: Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
NADPH	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit
TCA	: Triklor Asetik Asit
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
HOCl•	: Hipokloröz asit
(¹ Δ ¹ O ₂)	: Singlet oksijen

RCOO•	: Peroksil radikali
ONOO	: Peroksinitrit
NO ⁻	: Nitroksi anyonu
NO ⁺	: Nitrozil katyonu
HNO ₂	: Nitröz asit
NO	: Nitrik oksit radikali
NOO•	: Azot dioksit radikali
ONOO•	: Peroksinitrit radikali
LOOH	: Lipit peroksitleri
Cu,Zn SOD	: Bakır ve Çinko içeren dismutazlar
FeSOD	: Demir içeren dismutazlar
GST	: Glutasyon -S- Transferazlar
GR	: Glutasyon Redüktaz

1. GİRİŞ

Bitkiler, yüzyıllardır dünyanın hemen hemen her yerinde olduğu gibi ülkemizde de halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ülkemiz, bitkisel çeşitlilik yönünden oldukça zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginliğin nedenleri, iklimsel elverişlilik, farklı fitocoğrafyaların kesiştiği bölgede bulunması gibi nedenlerdir. Ülkemizde çok sayıda doğal bitki türü bulunmakta ve bunların önemli bir kısmı da endemiktir. Bu bitki zenginliğine rağmen birçok bitki türü için yeterince bilimsel çalışmalar yapılmamıştır.

Bitkilerin antioksidan aktivitesi ve sağlık açısından önemli özelliklerinin araştırılması çalışmaları giderek önem kazanmaktadır. Bu amaçla tedavide kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının 20.000 civarında olduğu belirtilmektedir.

Günümüzde, tıbbi bitkiler, daha yavaş iyileşme sağlamasına rağmen sentetik ilaçlara göre yan etkilerinin az olması ve doğal olmaları nedeniyle daha fazla ilgi görmektedir.

1.1. *Inula* Cinsinin Özellikleri

Inula cinsi tüm dünyada yaygındır ve bu cinse ait birçok tür yerel halk tarafından kullanılmaktadır. Bu cins antikanser, antibakteriyel, sitotoksik ve antiinflamatuvar özellikleri gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri ile bilinir. *Inula* türlerinin kimyasal yönden araştırılması ile bu cinse ait birçok önemli biyoaktif bileşen bulunmuştur. Bununla birlikte birçok *Inula* türü henüz fitokimyasal ve biyolojik yönden araştırılmamıştır. Son yıllarda *Inula* türleri, biyolojik aktiviteleri nedeniyle dikkat çekmiştir. Bu biyolojik değer fitokimyacıları *Inula* cinsinin kimyasal bileşenlerini araştırmaya yönlendirmiştir ve böylece monoterpenoidler, seskuiterpenoidler, diterpenler, flavonoidler ve glikosidazlar gibi birçok biyoaktif bileşen tespit edilmiştir (Macro vd., 1993). Bütün *Inula* türleri laktonlarca zengindir (Zhou vd., 1993).

Türkiye’de yetişen farklı *Inula* türleri şunlardır (Modanlıoğlu, 2012).

Inula acaulis Schott Et Kotschy Ex Boiss,
Inula anatolica Boiss,
Inula aschersoniana Janka,
Inula aucherana DC,
Inula britannica Linnaeus,
Inula conyzae (Griess.) Meikle,
Inula crithmoides Linnaeus,
Inula discoidea Boiss,
Inula ensifolia Linnaeus,
Inula fragilis Boiss. & Hausskn,
Inula germanica Linnaeus,
***Inula graveolens* (Linnaeus) Desf,**
Inula helenium Linnaeus,
Inula inuloides (Fenzl) Grierson,
Inula macrocephala Boiss. & Kotschy ex Boiss,
Inula mariae Bordz,
Inula montbretiana DC,
Inula oculus-christi Linnaeus,
Inula orientalis Lam,
Inula peacockiana (Aitch. & Hemsl.) Krovin,
Inula salicina Linnaeus,
Inula sarana Boiss,
Inula sechmenii Hartvig & Strid 7 *nula thapsoides* (Bieb. ex Willd.) Sprengel,
Inula viscidula Boiss. & Kotschy,
Inula viscosa (Linnaeus) Aiton,
Inula heterolepis Boiss.

1.2. *Inula graveolens* (L.) Desf. Türü

Inula graveolens (L.) Desf. bitki türü çok dallı, ağır kokulu, senelik yetişen, 1 metreye kadar boya ulaşabilen, küçük salgı tüyleri ile kaplı, dağınık tüylü, doğrusal mızrak yapraklı bir bitkidir. Capitula gevşek salkımlarını yayar. Pappus kahverengimsi, pul pul,

minicik bir bitki haznesi içerisinde taşınır. Akarsu kenarlarında kumlu ve çakıllı topraklarda yetişir. *Inula graveolens* (L.) Desf. Türkiyede “iri pire otu” olarak bilinir. Tıbbi ve aromatik (hoş kokulu) özelliklere sahiptir. Bitki alternatif tedavi amaçlı olarak birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde çokça kullanılır (Harnafi ve Amrani, 2008). Bitkilerde bulunan flavonoidler ve fenolik asit bileşenlerinin antioksidan ve serbest radikal giderici etki dahil antiinflamatuvar ve antikanserojen gibi etkiler gösterdikleri tespit edilmiştir. Şifalı bitkilerin potansiyel tedavi etkileri ile yeni kimyasal maddelerin önemli bir kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Bitki üzerinde yapılan araştırmalarda içeriğinin ağrı kesici, antiinflamatuvar ajan etkileri olduğu iddia edilmektedir. Halk arasında kalp kuvvetlendirici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır (Modanlıoğlu, 2012). Bu nedenle yeni analjezik ve anti enflamatuvar ilaçlar için verimli ve mantıklı araştırma stratejisi olarak görülmelidir.

Inula graveolens (L.) Desf. türünün biyolojik etkileri hakkında az sayıda yayın bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada, çeşitli modeller aracılığıyla *Inula graveolens* (L.) Desf. su ve etanolik ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini araştırmak amaçlanmaktadır.



Şekil:1.1. *Inula graveolens* (L.) Desf. bitki türü

Inula graveolens (L.) Desf. türünün sistematığı aşağıda gösterilmiştir.

Alem:	Plantae
Alt alem:	Tracheobionta
Şube:	Magnoliophyta
Sınıf:	Magnoliopsida
Alt sınıf:	Asteridae
Takım:	Asterales
Aile:	Asteraceae
Cins:	<i>Inula</i>
Tür:	<i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.

1.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlara sahip kimyasal olarak çok aktif atom veya moleküller olup ortamdaki diğer biyomoleküllere saldırırlar ve onların biyolojik yapılarını bozarlar. Bu serbest radikaller nükleik asitler, proteinler, lipitleri ve diğer biyomolekülleri oksitleyerek bunların metabolizmadaki fonksiyonlarını bozarlar (Fantel, 1996; Temple, 2000).

Biyokimyasal reaksiyonlar atomların dış orbitallerinde bulunan elektronlar sayesinde gerçekleşir. Elektronlar normal şartlarda elektron çiftleri halinde bulunurlar. Serbest radikaller, bir veya daha çok çiftlenmemiş tek elektron içeren moleküller veya atomlar olarak tanımlanırlar. Eşleşmemiş bir elektron içeren oksijen atomundan oluşan süperoksit ve hidroksil radikalleri serbest radikallere örnek olarak verilebilirler (Tamer vd., 2000).

Bir kimyasal bileşik veya atomun son yörüngelerinde eşleşmemiş elektronlar bulunması kimyasal reaktiviteyi artırdığı için, serbest radikaller çok reaktif kimyasal yapılardır. Asal gazlar bütün orbitalleri elektronlarla tamamen doyurulduğu için çok

kararlı yapılara sahip olup kimyasal olarak reaktif değildirler. Bu yönü ile serbest radikallere benzemezler (Kılınç, 2002).

Bir bileşik üç şekilde serbest radikal haline gelebilir. Bunlar; atomun veya molekülün bir elektron kazanmasıyla veya bir elektron kaybıyla veya bileşikteki kovalent bağın simetrik kırılması sonucu iki yapının birer elektron kazanmasıyla serbest radikal haline geldikleri homolitik bağ kırılmasıyla gerçekleşmektedir (Halliwell, 1996).

Serbest radikalleri oluşturan eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili olup başka yapılardaki elektron çiftlerini ayırarak o yapıların fonksiyonlarına engel olurlar. Bu süreçte serbest radikal kendine bir elektron alarak bir elektron çifti haline dönüşürken, diğer tarafta eşleşmemiş bir elektrona sahip yeni bir serbest radikal oluşur. Sonuçta serbest radikal etki ettiği atom ya da molekülü serbest radikale dönüştürmüştür. Bu olaylar kontrolsüz olarak artış gösterirse hücrede yapısal hasarlara neden olurlar (Gümrükçüoğlu, 2002; Nelson ve Cox, 2004; Gülçin, 2007).

Serbest radikallerin çok yüksek miktarda üretimi metabolizma için tehlike oluşturur. Buna karşın, serbest radikaller vücuda giren bakterileri ve diğer mikroorganizmaları hücre membranlarını parçalayarak hastalıklara karşı direncimizi artırdıkları için vücudun hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler.

Serbest radikallerin hücrelerde protein, lipit, karbonhidrat ve nükleik asitler üzerinde önemli olumsuz etkileri vardır. Özellikle proteinlerdeki karbonil gruplarına ve peptit bağlarına saldırabilir ve hücre membranında bulunan proteinleri yıkarak hücrenin ölümüne sebep verebilirler. Hücredeki iyon transportunu bozarak hücrenin membran potansiyeline ciddi zararlar verebilirler (Kanbur, 2012).

Serbest radikaller, biyolojik membranlarda bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitlerini peroksidasyona uğratarak membranların yapısının bozulmasına, proteinlerin denatürasyonuna, karbonhidrat polimerlerinin yıkılmasına, ayrıca DNA ile reaksiyona girerek istenmeyen mutasyonlar oluşmasına sebep olurlar (Cheeseman ve Slater, 1993).

Serbest radikaller, birçok hastalıkla ilişkili olması ve bu hastalıklara eşlik eden çeşitli komplikasyonların ortaya çıkışında merkezi rol oynaması sebebiyle son yıllarda araştırmacıların çalışmalarında ilgi alanı haline gelmiştir. Özellikle vücutta oluşan oksijen radikallerinin kalp hastalıkları, Alzheimer, Parkinson, serebrovasküler

rahatsızlıklar, nörosensoryel bozukluklar, katarakt ve romatoid artrit gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca yaşlanma sürecinde gözlenen cilt kırışıkları, böbrek fonksiyonlarında azalma ve gibi belirtilerde de serbest radikallerin ana faktör olduğu düşünülmektedir (Cross vd., 1987).

Serbest radikaller giderilmedikleri takdirde hücrelerdeki makromoleküllere ciddi zarar verir. Serbest radikallerin bu olumsuz etkileri, serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulduğu ve oksidatif stres olarak bilinen durumla yakından ilişkili olup çeşitli hücre hasarlarına (lipit peroksidasyonu, proteinler arasında disülfid bağlarının oluşumu, DNA hasarı gibi) neden olmaktadır (Bursal ve Gülçin, 2011). Serbest radikallerin sebep olduğu hastalıklar Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Serbest radikallerin sebep olduğu hastalıklar (Boğa, 2014)

Hastalık türleri
Anoksia
Nöral lipofuskinosis
Parkinson
Alzheimer
Down Sendromu
Multiple skleroz
Kronik granümatöz
Diabetes mellitus
İnflamatory (ateşli) düzensizlikler
Astım
Romatizmal artrit
İdiyopatik hemokromatozis sonucu
Talasemia
Akciğer düzensizlikleri
Asbestosis
Yetişkin solunum stresi sendromu
Zehirlenme (reperfüzyon)
Solar radyasyon zehirlenmesi
Bloom sendromu
Toksik maddelerin oluşumu
Zenobiyotikler
Bloom sendromu
Aterosklerozis (Damar sertliği)
Sitositotikler (blomyein)
Kanser

Birçok etken serbest radikal oluşumuna etki eder. Vücudumuzda enerji üretilirken her saniyede milyonlarca serbest radikal oluşur. Ayrıca çevre kirliliği, kimyasal maddeler, petrokimya ürünleri, sanayi atıkları, ilaçlar, güneşin UV ışınları, X ışınları, virüsler, stres, sigara ve egzoz dumanı gibi birçok etken serbest radikal oluşumunu artıran faktörlerdir. Ayrıca radikaller mitokondriyal ETS zinciri siklooksijenaz döngüsü gibi reaksiyonlarda üretilebileceği gibi dışardan alınan ilaçlar tarafından da meydana getirilebilirler. İşlenmiş gıdalarda bulunan yüksek şeker ve yağ oranları, alkol tüketimi, stres ve yoğun egzersizlerde artan oksijen kullanımı vücudumuzdaki serbest radikallerin üretimini artıran etkenlerden bazılarıdır (Mortaş, 2012).

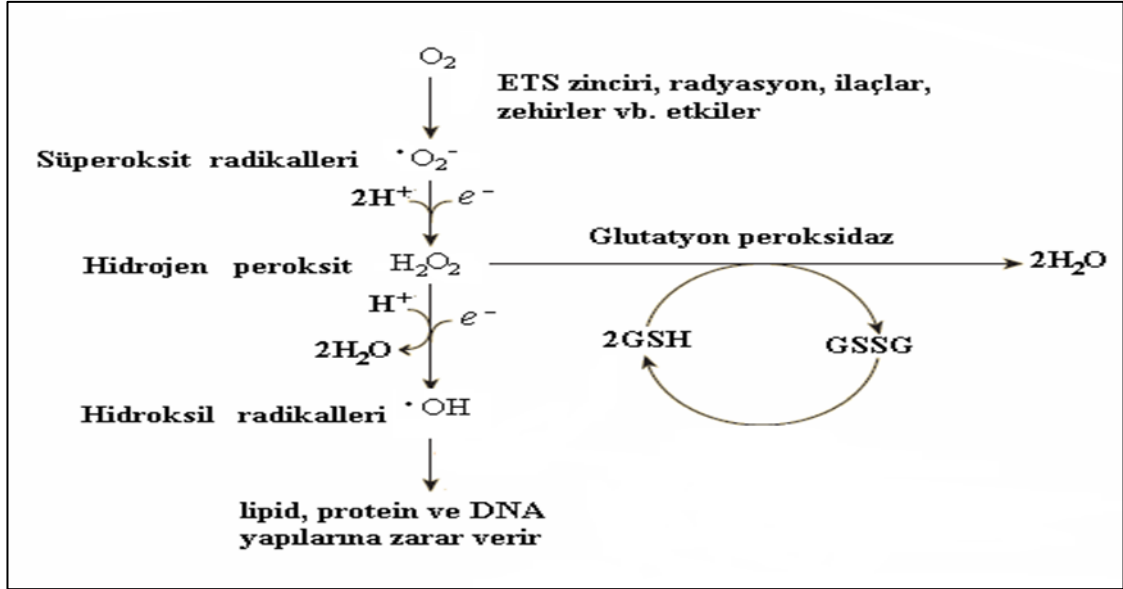
Metabolizmadaki serbest radikallerin en büyük kaynağı reaktif oksijen türleridir. Reaktif oksijen türlerinin oluşma kaynakları endojen (vücut içi) kaynaklı ve eksojen (vücut dışı) kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılır.

Endojen kaynaklı olanlar; elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik prosesler iken, dış kaynaklı olanlar ise UV ışınları, radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, yanlış beslenme ve kanserojen maddelerdir. Bunlar serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları olarak bilinir (Aksoy, 2002).

Çizelge 1.2. Serbest radikal kaynakları (Aksoy, 2002)

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Oksidatif	Zararlı ışınlar (x-ray, UV)
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit metabolizması	Organik solventler

Metabolizmada oluşan ve dış kaynaklı radikal ve reaktiflerin oluşum yolları Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Serbest radikal ve reaktif türlerinin oluşumu (Bursal, 2009)

Oksijen, atomik halde kararlı olmadığı için doğada moleküler halde bulunur. Oksijen gazı (O_2), ozon (O_3) ve oksitler dünyamızdaki oksijen kaynaklarıdır. Yer kabuğunda (%53.8) ve insanda (%61) bulunan en yaygın elementtir. Biyosferde ise en yaygın ikinci elementtir (Gutteridge, 1989). İnsan hayatının devamı için oksijen şarttır. Böyle olmakla birlikte oksijenin eksik indirgenmesi sonucunda ise hücreye zarar verebilecek reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (Davies, 2000).

Reaktif oksijen türleri ve diğer türleri reaktivesi yüksek moleküllerdir. Proteinler, lipidler, nükleik asitler gibi metabolizmada yapısal türler ile kimyasal reaksiyona girerek bunların fonksiyonlarının bozulmasına ve bu maddelerin aktif yapılarını kaybetmelerine sebep olabilirler. Bu etkilerinden dolayı bunlara reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) denir (Halliwell, 1996; Stadtman, 2002).

Hücrede serbest radikallerin üretiminin yüksek miktarda artması “oksidatif stres” olarak tanımlanır. Bu olay, hücre bileşenlerini oluşturan biyomolekülleri olumsuz

etkiler. Bunun yanında hidroksi radikali (OH[•]) başta olmak üzere pek çok serbest radikal, DNA'daki organik bazların değişimine ve DNA zincirinde kırılmalara neden olur. Bunun sonucunda kanser, erken yaşlılık ve hücre ölümüne varabilen süreçler başlayabilir (Bursal vd., 2013).

ROS, insan vücudundaki metabolik reaksiyonlar sonucu sürekli oluşmaktadır (Langseth, 1995). ROS, vücuttaki birçok oksidatif biyokimyasal reaksiyonun yan ürünü olduğu için çeşitli hastalıklara ve doku hasarına yol açtığı bilinmektedir (Whitehead vd., 1992; Yen ve Chen, 1995).

Canlı metabolizmada endojen kaynaklı birçok reaktif oksijen türü ve serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin hücreler arası iletişim gibi görevleri olmakla beraber bunların aşırı miktarda oluşması oksidatif stres, erken yaşlanma, hücre fonksiyonlarının ve biyokimyasal moleküller yapılarının bozulması gibi birçok rahatsızlıkların oluşmasına sebep olur (Nordberg ve Arner, 2001). Olumsuz olarak etkilenen bir sistem, bağlantılı olduğu diğer sistemlere etki eder ve zincirleme problemler oluşur.

Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra bazı reaktif azot türleri de (RNS) vücutta meydana gelmektedir. Oksidatif strese en çok sebep olan faktörlerden reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri Çizelge 1.3'te gösterilmiştir.

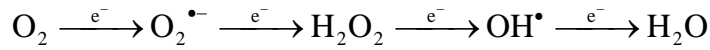
Çizelge 1.3. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri (Aruoma ve Cuppett, 1997)

Reaktif Oksijen Türleri		Nitrik Oksit Radikali	
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Nitrik oksit radikali	•NO
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Azot dioksit radikali	•NOO
Hidroksil radikali	OH [•]	Peroksinitrit radikali	•ONOO
Hipokloröz asit	HOCl [•]	Nitröz asit	HNO ₂
Singlet oksijen	(¹ Δ ¹ O ₂)	Nitrozil katyonu	NO ⁺
Organik radikaller	RO [•] , R [•] , R-S	Nitroksi anyonu	NO ⁻
Peroksil radikali	RCOO [•]	Peroksinitrit	ONOO

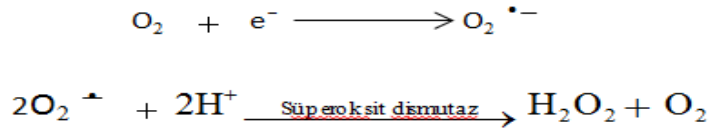
Normal metabolik olaylar sırasında oksijenin kullanılmasında oluşan süperoksit radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikali gibi yapılar reaktif

oksijen türlerinin en önemlileridir. Bu türler başka serbest radikallerin üretildiği zincir reaksiyonları başlatabilir ve hücrede diğer organik radikallerini (R[•]), peroksit radikallerini (ROO[•]), alkoksi radikallerini (RO[•]), tiyil radikallerini (RS[•]), sülfenil radikallerini (RSO[•]) ve tiyil peroksit radikallerini (RSO₂[•]) oluşturabilirler (Tietz, 1995; Dawn vd., 1996; Burtis ve Ashwood, 1999).

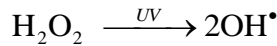
Yüksek indirgeme potansiyeline sahip elektronlar, mitokondri iç membranında elektron transport sistemi ile moleküler oksijene (O₂) transfer edilir. Mitokondrial elektron transport sisteminde, elektronların O₂'ye transferi sırasında oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri oluşur. Bu ürünler çok reaktif yapıdadır 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.



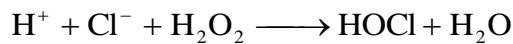
Moleküler oksijenin (O₂) mitokondrial elektron transport sisteminde bir elektron alması sonucu süperoksit radikali (O₂^{•-}) oluşur. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini inhibe ederler.



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.



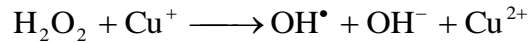
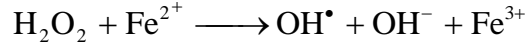
Ayrıca hidrojen peroksit reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (Bursal, 2013; Asad vd., 2004).



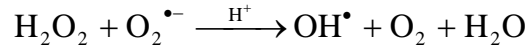
Hidroksil radikali; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok

güçlü bir şekilde saldırarak oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakan ve yarı ömrü 10^{-9} saniye gibi çok kısa olan bir reaktif oksijen türüdür. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucunda açığa çıkar. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir (Fantel, 1996; Halliwell, 1996; Nordberg ve Arner, 2001).

Fenton Reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



1.3.1. Serbest radikallerin biyolojik etkileri

1.3.1.1. Proteinlere etkisi

Kükürt içeren aminoasitler ve doymamış aminoasitlerin (triptofan, tirozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin) serbest radikallerle reaksiyonları sonucu kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Aktifliği, yukarıdaki aminoasitlere bağlı olan papain ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimler, radikallere maruz kaldıkları zaman inhibe olurlar. Sitoplazmik ve membran proteinleri, çapraz bağlanma sonucu dimerleşirler. Çok aktif olan HO^\bullet radikalleri, peptit ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olarak onların yapı ve fonksiyonlarını bozarlar.

1.3.1.2. Nükleik asitlere etkisi

Elektromanyetik alanda, ultraviyole ve X-ışınlarına maruz kalan canlı hücrelerdeki DNA'lar hidroksil radikallerinin saldırısına uğrarlar ve DNA'daki organik bazlar ve deoksiriboz fosfatları etkilenirler. Hidroksil radikalleri, DNA bazlarını modifiye ederek riboz-fosfat zincirlerinin kırılmasına yol açarlar.

In vitro çalışmalarda, sulu ortamda HO^\bullet radikallerinin, deoksiriboz ve organik bazlar ile kolaylıkla reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir. Fakat çift zincirli DNA

molekülünde, organik bazlar HO[•] radikallerine karşı sterik olarak korundukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, enzimatik radikal yakalayıcılar, öncü HO[•] radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar. Serbest radikal etkisiyle DNA yapısının değişmesi mutasyonlara ve canlının eşey hücrelerindeki döllerin ölmesine neden olur.

1.3.1.3. Zar yapısındaki lipidlere etkisi

Membran kolesterolü ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyona uğrarlar. Radikallerin reaksiyonu sonucu, lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler oluşur.

Reaktif oksijen türleriyle ilgili olarak, lipit peroksidasyon çok araştırılan bir konudur. Çoklu doymamış yağ asitleri, birden çok çift bağ içermelerinden dolayı, serbest radikal ataklarına en uygun hedefler olmaktadır. Bu gibi oksidasyonlar aterosklerotik plakların oluşumunun da nedeni olarak gösterilmektedir. Plak oluşumundan kaynaklanan kardiyovasküler hastalıklar, en azından Batı ülkelerinde, total hastalık miktarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Nordberg ve Arner, 2001). Bu nedenle, lipid peroksidasyonun önlenmesi veya düşüşü son derece önemlidir.

Serbest oksijen radikalleri, hücre ve organel zarlarında lipit peroksidasyonuna neden olabilmektedirler. Reaktif oksijen türleri tarafından en fazla etkilenen moleküllerin, hücre membranının ana bileşeni olan lipidler olduğu düşünülmektedir. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekül varlığında lipit peroksidasyonu kolaylıkla başlar. Oksijenin sebep olduğu lipit oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur. Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları içinde zararlıdır (Boğa, 2014).

Biyolojik membranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipitlerinde bulunan doymamış yağ asitleri sebebiyle oksidatif ataklara karşı duyarlıdırlar. Reaktif ve radikal türler ile hücre hasarı meydana gelirken lipit serbest radikalleri ve lipit peroksitleri de oluşmaktadır. Bu tip serbest radikal otooksidasyonu reaksiyonlarında zincirleme reaksiyonun başlaması için bir tetikleyici (başlatıcı) faktör gereklidir. Bu tetikleyici faktörün OH[•] radikali olduğu kabul edilmektedir.

Serbest radikallerin meydana getirdiği en önemli hasarlardan biri olan lipit peroksidasyonu, membranların yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksijen radikallerine maruz kalması sonucunda oluşmaktadır.

Transmembran iyon gradientini bozarak Ca^{+2} gibi iyonlara karşı spesifik olmayan geçirgenliği arttırabilmektedir. Mitokondride oksidatif fosforilasyonu çözerler ve mikrozomal enzim aktivitelerinde değişiklik oluşturabilirler. Subsüller organellerin (lizozom gibi) bütünlüğün kaybolmasına yol açabilirler. Ayrıca, DNA ile reaksiyona girebilmektedirler (Ercan, 2008).

1.3.1.4. Sitolitik moleküllere etkisi

Çözünür karakterli birçok hücre bileşeni, serbest radikalleri yok edici görev yapar. Örneğin oksihemoglobin gibi hemoproteinler $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturur. Bu reaksiyon, hemoproteinlerin oksijen radikalleri tarafından kolaylıkla tahrip edebileceğini göstermektedir. Diğer önemli bir sitoplazmik hemoprotein, katalaz enzimidir. Katalaz $O_2^{\bullet-}$ radikali tarafından aynı şekilde tahrip edilmektedir. Bu olay katalaz aktivitesinin düşmesine ve hücrenin daha çok radikal ve hidrojen peroksit tahribatına maruz kalmasına yol açmaktadır.

1.3.1.5. Hücre dışı etkiler

Osteoartritlerde, serbest radikallerin, kollajen ve hıyaluronik asit üzerine etkileri sonucu, dejenerasyon ve buna bağlı olarak iltihabi bir durum olduğu gözlenmiştir. Sinoviyal sıvıya vizkozite sağlayan hıyaluronik asit $O_2^{\bullet-}$ radikal ile etkileşince depolimerizasyona uğrar. Süperoksit dismutaz ve katalaz hücre dışı sıvılarda çok düşük aktiviteli olduklarından az miktardaki oksijen radikalleri bile büyük hasarlara yol açabilmektedir (Akpoyraz ve Durak, 1995).

1.4. Antioksidanlar

Oksijenli yaşama geçiş ile oksijensiz yaşam canlıları buldukları ortama ya adapte olmuşlar ya ölmüşler ya da oksijensiz yerlere göç etmişlerdir. Adapte olabilenler (aerobik organizmalar), antioksidan savunma mekanizmaları geliştirerek kendilerini

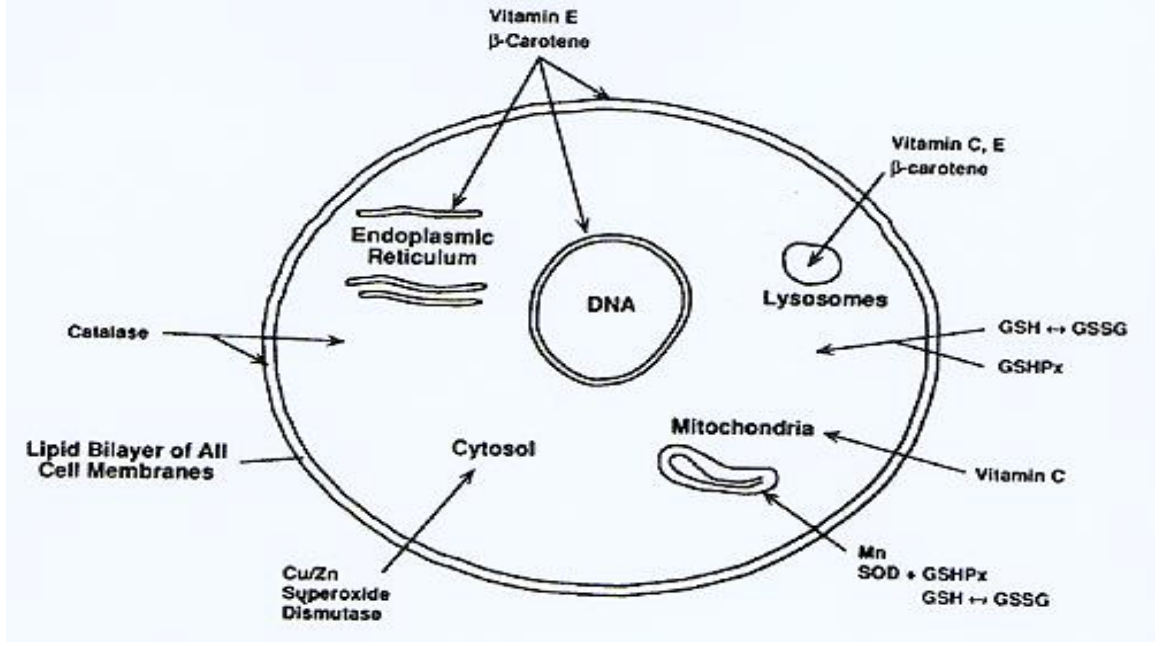
oksijenin zararlı etkilerinden koruyabilmişlerdir. Aerobik organizmalar değişik tipte antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir (Halliwell, 1994).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ve bunların neden oldukları hasarları önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinir (Akkuş, 1995).

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Mercan, 2004).

Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı olup serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halindeki birçok bileşiklerdir. Bu bileşikler, gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, serüloplazmin gibi) ve bitkilerde daha yaygın şekilde bulunan antioksidan fitonutrientlerdir (Çizelge 1.4).

Antioksidan sistemler, radikal oluşumunu önleyerek oksidatif hasarları engeller, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler. Antioksidanların hücrel etkileri Şekil 1.3'te gösterilmektedir. Buna göre hem eksojen hem de endojen antioksidan madde ve enzimler hücrenin hasar görmüş bütün kısımlarına müdahale ederek oksidanların etkisini ya azaltarak ya da ortadan kaldırarak etki eder.



Şekil 1.3. Antioksidanların hücrel etkileri (URL 1)

(http://www.medscape.org/viewarticle/432384_5, erişim Tarihi: 22.01.2013).

Antioksidanlar organizmayı dört ayrı şekilde etkiler (Biçim, 2013).

1. Scavenging (Temizleme): Oksidanların zayıf bir moleküle çevrilmesi enzimler aracılığıyla yapılır. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
2. Quencher (Baskılama): Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.
4. Zincir koparma: Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

Çizelge 1.4. Antioksidan moleküller (Yalçın, 1992).

	Enzimler		Yağda çözünen bileşikler
Antioksidan Enzimler/Proteinler	Glutasyon peroksidaz Glutasyon S-transferaz Katalaz Mitokondriyal sitokrom oksidaz Süperoksit Dismutaz (SOD)	Küçük Moleküller	α - tokoferol (Vitamin E) β -karoten Bilirubin Flavonoidler Ubikinol
	Metal bağlayıcı proteinler		Suda çözünen bileşikler
	Albumin Ferritin Hemopeksin /Haptoglobulin Serüloplazmin Transferrin		Askorbik asit (Vitamin C) Glutasyon Sistein Ürik asit

1.4.1. Endojen antioksidanlar

Antioksidan enzimler, yeni bileşikleri sentezleyen sistemler, tamir sistemleri, hemoglobin, miyoglobin, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcılar endojen antioksidan sistemleri oluşturur. Ayrıca glutasyon ve ürik asit gibi vücut içi küçük molekül kütleli bileşikler de birer antioksidan olarak görev yaparlar. Dış kaynaklı olarak alınan antioksidanlar vücut içi antioksidan sisteme destek olur. Çizelge 1.5'te önemli endojen antioksidanlar ve temel fonksiyonları özetlenmiştir.

Çizelge 1.5. Endojen antioksidanlar (Aslan, 1995).

Antioksidanlar	Fonksiyonları
Sitokrom oksidaz	Süperoksit nötralize eder
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Süperoksiti H ₂ O ₂ 'e çevirir
Katalaz (CAT)	Peroksitleri nötralize eder
Glutasyon peroksidaz (GPX)	Lipit peroksidasyon ürünlerini indirger
Glutasyon redüktaz (GSH-Rd)	Disülfidleri indirger
α -tokoferol	Peroksidasyonu önler
β-karoten	Peroksilleri giderir
Glutasyon (GSH)	Redoks substratı
Ürik asit	Hidroksil toplar, C vitaminini korur
Sistein	Organik bileşikleri indirger
Albumin	Serbest radikal gidericidir
Bilirubin	Zincir kırıcı antioksidandır
Serüloplazmin	Süperoksiti H ₂ O ₂ 'e çevirir
Transferrin	Demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Doku demiri bağlayıcısıdır
Askorbik asit	Vitamin E'yi rejenere eder

1.4.1.1. Enzimatik endojen antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD):Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit anyon radikallerini moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştüren, molekül ağırlığı 17-85 kDa aralığında olan metalloenzimlerdir. Süperoksit dismutaz enzimi moleküler oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Canlı için oksijen toksisitesini önleyen önemli bir savunma görevi görerek, süperoksitin zararlı etkilerine karşı koruma sağlar.

Süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü yüksek aktiviteyle katalizler. (Özdemir, 2011).

Katalaz (CAT): Hücre peroksisom organellerinde bulunan katalaz enzimi, hidrojen peroksidin su ve moleküller oksijene dönüşümünü sağlar. Hidrojen peroksidi giderme etkisi nedeniyle antioksidan etkilerinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

SOD ve katalaz enzimleri hem bitkisel hem de hayvansal ürünlerde bulunmaktadır. Bu iki enzimin antioksidan aktivitesinin tespiti için çok sayıda çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda antioksidan etkileri, lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı ve stres azaltıcı etkileri gösterilmiştir (Derviş, 2011).

Glutasyon Peroksidaz (GPx): Glutasyon peroksidaz (GPx), pek çok hücrede sitozollerde bulunan bir enzimdir. Sitozol ve mitokondrilerde SOD enzimi tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti ve yağ asidi hidroperoksitlerini ortadan kaldırmaktadır. Kapasitesi sınırlıdır ve düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunda aktivite göstermektedir. Kofaktör olarak selenyum elementi kullanılır. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (Ercan, 2008). Eritrositlerde bu enzim oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. Ayrıca yapılan çalışmalarda diyabetli hastalarda serum glutasyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir (Memişoğulları, 2005).

Hücrelerde oluşan hidrojenperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Altbirimleri bir Se atomu içerdiğinden, hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür (Günaldı, 2009).

Glutasyon-S-Transferazlar (GST): Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alır. Antioksidan aktivitelerine ek olarak bilirubin, bazı kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşsüz olarak bağlanarak bunların hücre içi transportunda da görev almaktadır.

Glutasyon Redüktaz (GR): Glutasyon peroksidaz tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutasyona dönüşmektedir. Oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutasyona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (Köksal vd., 2012).

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz:Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz süperoksit radikalini suya çevirerek etki gösterir (Ercan, 2008).

1.4.1.2. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar

Glutasyon: Hücre içerisinde GSH indirgen formunda bulunur. Endojen üretilen peroksitlere karşı onları indirgeyerek kendisi GSSG yükseltgenmiş formuna dönüşür. Yapılan bazı çalışmalarda GSH düzeylerinin diyabette sağlıklı kişilere göre anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmiştir (Memişoğulları, 2005).

Transferrin:Serbest demir iyonlarını bağlar ve fenton reaksiyonlarını önler.

Laktoferrin:Düşük pH'lı ortamlarda bulunan demir iyonlarını bağlar.

Sistein:Süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısıdır.

Ürik asit:Genelde metal şelatörü olarak çalışırken başka radikalleri de toplar.

Albümin: Hipokloröz radikallerini toplayarak proteinleri ve metal iyonlarını bağlar.

Bilirubin: Önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır.

Melatonin: Hidroksil radikallerini temizleyen çok güçlü bir antioksidandır. Diğer antioksidanlara göre çok güçlü olmasının nedeni, lipofilik olması nedeniyle hücre organellerine ve birçok dokuya rahatça girebilerek geniş bir alanda aktivite gösterir. Hücre çekirdeğine de girebilmesi nedeniyle DNA'yı oksidatif hasarlara karşı korur. Yüksek dozlarda kullanımının toksik etki yaratmadığı rapor edilmiştir (Aydemir vd., 2009).

1.4.2. Eksojen antioksidanlar

Vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar Çizelge 1.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 1.6. Eksojen antioksidan ilaçların kullanımı (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009)

Antioksidan	Reaksiyonu
Allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit, tungsten	Ksantin oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder.
Adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvarlar	NADPH oksidaz inhibitörüdürler
Trolox-C	Vitamin E analogu olarak görev yapar.
Ebselen, asetilsistein	Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) artırır.
Mannitol	Hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterirler.
Desferroksamin	Serbest ferri demiri (Fe ³⁺) bağlar.
Demir şelatörleri	Hücre içine girerek serbest demiri bağlayarak fenton reaksiyonu ve hidroksil radikalini engeller.

1.4.2.1. α -tokoferol (E vitamini): E vitamini yağda çözünen bir vitamindir ve zincir kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. E vitamini lipit peroksidasyonunu engelleyerek diğer oksidatif reaksiyonlar esnasında üretilen radikallerin etkisini önlemektedir. Ayrıca hücrel sinyal olarak da görev yapar (Koç ve Üstün, 2008).

E vitamininin kalp-damar hastalıklarını azaltma etkisi aşağıda verilen 3 yolla olmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2005).

- E vitamini damar duvarlarında yağ plaklarının oluşum basamaklarından ilkinin bloke ederek LDL formunu serbest radikal zararlarına karşı korumaktadır.
- Damarlarda kanın akışını azaltan düz kas hücrelerinin artmasını önlemektedir.
- Kalp krizine neden olan kanın pıhtılaşma eğilimini azaltmaktadır.

1.4.2.2. β -karoten:Sadece bitkilerden sentezlenir ama besin zinciri yoluyla hayvanlara da transfer edilir. Bir provitamin A bileşiği olan β -karoten, kanser ve ateroskleroz gibi hastalıkları kontrol etmede önemli rol alan bir antioksidandır (Diken, 2009). Düşük oksijen basıncında peroksil radikali ile direk reaksiyona girmekte ve bu durum yüksek oksijen basıncında vitamin E'nin aynı etkisi ile sinerji oluşturmaktadır (Çaylak, 2011).

1.4.2.3. Askorbik asit (C vitamini):Dolaşım sisteminde serbest radikallere karşı ilk savunmayı sağlar. Lipit peroksidasyonunu engeller. E vitamininin rejenarasyonunu sağlayarak antioksidan etkinliğini artırır. Yüksek dozda alınan C vitaminin (2 g) yan

etkisi bulunmadığı saptanmıştır. İnsan derisinde ultraviyole ışınların oluşturduğu oksidatif strese karşı önleyici etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Askorbik asit kolayca okside olabileceği için yiyecekleri pişirirken ve hazırlarken yiyecekte bulunan askorbik asitin çoğu kaybedilmektedir. Bu yüzden C vitamini ihtiva eden besinlerin az pişirilmesi veya çiğ tüketilmesi önerilmektedir (Müftüoğlu, 2003).

1.4.2.4. Folik asit (folat):Merkezi sinir sistemi için gerekli olan bir vitamindir. Dopamin, serotonin, nöroepinefrin gibi nörotransmitter maddelerin sentezinde rol oynar.

1.4.2.5. Fenolik bileşikler: Fenolik bileşikler çoğu bitkilerde bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan ve insanın sağlıklı yaşamında esansiyel olan bileşiklerdir. Fenolik bileşikler önemli antioksidan aktivite gösteren kimyasal yapılara sahiptirler. Polifenoller, aromatik yapılarında birden fazla hidroksil taşıyan yapılardır. Bitki polifenollerinin antioksidan karakterleri, indirgeme aracı ve hidrojen atomu verici olmalarıyla sağlanır. 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 derişimlerde bulduklarından, otoksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonları erteleme, geciktirme veya önleme özelliklerine sahip olmalıdır.
- Süpürme (scavenging) sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kırmada kararlı olmalıdır (Karaman, 2008).

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

Çizelge 1.7. Vitamin C, Vitamin E ve β -karotenin bazı hastalıklar üzerine etkisi (Veliöğlu, 2000)

Hastalık	Vit C	Vit E	β-Karoten
Kardiyovasküler hastalıklar	+	+++	+
Kanser	++	++	+
Katarakt	++	++	++
Bağışıklık fonksiyonu	++	+++	++
Artrit	+	+	+
Alzheimer hastalığı	-	++	-

(-: İlgı çok az ya da hiç yok, +: Kısmen ilişkili, ++: İlişkisi var, +++: Önemli ilişkisi var)

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan bitki materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyali olan *Inula graveolens* (L.) Desf. bitki türü 20.08.2014 tarihinde Bingöl ilinde bulunan Haserek Dağı'nın kuzeyinde, 1900-1950 m yüksekliğindeki taşlık alandan toplanmıştır. Bitkinin türünün teşhisi Flora of Turkey, 7.cilte göre (Davis, 1978), Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer KILIÇ tarafından yapılmıştır.

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Antioksidan aktivite kapasitesi belirleme için yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerden DPPH (1.1-difenil-2-pikril-hidrazil) radikali ve neokuprin Sigma-Aldrich'ten satın alındı. FeCl₂, NH₄SCN, Na₂HPO₄, K₃Fe(CN)₆, TCA (Triklor asetik asit), FeCl₃, etanol ve saf su Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edildi. Fenolik içerik analizinde kullanılan standart fenolik bileşikler Dicle Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi.

2.1.3. Yararlanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
LC (Sıvı Kromatografisi)	: Shimadzu Nexera HPLC, LC-30AD
MS (Kütle Spektrometresi)	: Shimadzu LCMS 8040
Derin dondurucu	: Sanyo, Japan
pH-metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Scaltec SBA 41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Liyofilizatör	: Labconco
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Evaporatör	: Heidolph 94200, Bioblock Scientific
Saf su cihazı	: Firstream Calypso MK 1 Glass Still

Magnetik karıştırıcı : Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti : 3 cm³'lük quartz küvet

2.2. Metot

2.2.1. Numunelerin su ekstralarının hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız *Inula graveolens* (L.) Desf. yaprak kısımları toplandı ve güneşte kurutulduktan sonra mutfak robotu (parçalayıcı) cihazı ile parçalandı. *Inula graveolens* (L.) Desf. su ekstrelerini hazırlamak için parçalanmış numunedan 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 ekstraları birleştirildikten sonra cam balonlara alındı ve derin dondurucuya konuldu. Dondurulmuş ekstraları 50 mm Hg basınç altında liyofilizatör cihazında kuru olana kadar liyofilize edildi. Liyofilize edilmiş numunedan 20 mg alınarak 20 ml saf suda çözüldü ve stok çözelti hazırlandı.

2.2.2. Numunelerin etanol ekstralarının hazırlanması

Inula graveolens (L.) Desf. etanol ekstresi hazırlanması için parçalanarak ufaltılmış 50 gr bitki numunesi üzerine 100 ml etanol ilave edildi. 12 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. 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 ekstraları birleştirildikten sonra cam balonlara alındı ve rotary evaporatör cihazında etanol tamamen uzaklaştırıldı. Bu numunedan 20 mg alınarak 20 ml etanolde çözüldü ve stok çözelti hazırlandı.

2.2.3. DPPH[•] (1,1-difenil 2-pikril hidrazil) giderme aktivitesi

Çalışma bitkisinden elde edilen ekstraların serbest radikali giderme aktivitesi DPPH[•] için Blois metoduna (1958) göre gerçekleştirildi. Bu işlem için öncelikle serbest radikal çözeltisi hazırlandı. DPPH[•] serbest radikalden 39 mg alındı ve 100 ml etanolde çözülerek 1 mM DPPH[•] serbest radikali çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti olarak hazırlanan numunelerden deney tüplerine sırasıyla değişik konsantrasyonlarda (10-30

$\mu\text{g/ml}$) 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 absorbanlar ölçüldü. Kör olarak sadece etanolden oluşan absorban 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 vermektedir.

2.2.4. FRAP metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Inula graveolens (L.) Desf. su ve etanol ekstralarının ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvveti Oyaizu (1986) metoduna göre tayin edildi. 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 absorbanlar ölçüldü (Bursal, 2009).

2.2.5. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Inula graveolens (L.) Desf. su ve etanol ekstralarının kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi Apak ve arkadaşlarının kullandığı Kuprak 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 $\mu\text{g/ml}$) ekstralar ve standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbanları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbanı artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini göstermektedir.

2.2.6. LC-MS/MS ile fenolik içerik analizi

2.2.6.1. 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.

2.2.6.2. 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.

2.2.6.3. MS cihazlandırılması

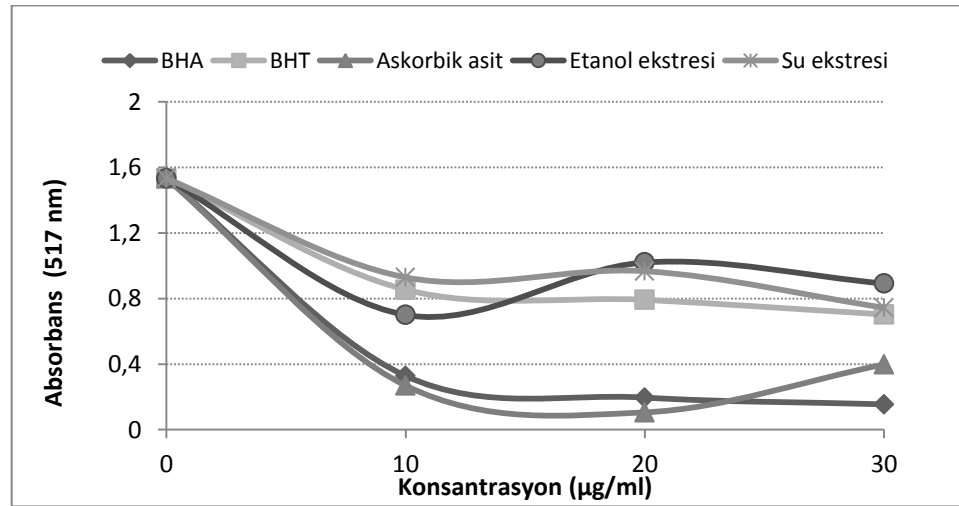
MS tespiti Shimadzu LCMS 8040 modeli üçlü, dört kutuplu ve hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında ESI kaynak işletimi ile donatılmış kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı. LC-MS/MS verileri Lab Solutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile elde edilerek hesaplamalar yapıldı. Çoklu reaksiyon 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 arayüz sıcaklığı, 250°C DL sıcaklığı, 400°C ısı bloğu sıcaklığı, 3 L/dak. nebullizer gaz akışı (azot) ve 15 L/dak. kurutucu gaz akışı (azot) olarak belirlendi (Ertaş vd., 2015).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Doğal bitkilerden elde edilen ekstrelerden veya bunlardan saflaştırılan etken maddelerin antioksidan aktivitelerinin araştırılması bilim adamlarınca son yıllarda yaygın olarak çalışılmaktadır. Bu amaçla radikal giderme, metal şelatlama ve metal iyonlarını indirgeme kapasitelerinin araştırılması yöntemleri kullanılmaktadır (Bursal, 2009). Bu çalışmada da DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP metoduna göre ferrik iyonları indirgeme kapasite tayini ve Kuprak metoduna göre kuprik iyonları indirgeme kapasite tayini metotları kullanıldı. Bulgulardan elde edilen antioksidan aktiviteler birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırıldı.

3.1. 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 *Inula graveolens* (L.) Desf. su ve etanol ekstrelerinin de standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve askorbik asit gibi etkili DPPH' serbest radikali giderme aktivitesinin olduğu Şekil 3.1'deki azalan absorbans eğiminden anlaşılmaktadır.



Şekil 3.1. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) DPPH' radikali giderme aktivitelerinin karşılaştırılması

DPPH' radikalini giderme yüzdeleri ile ilgili hesaplamalar verilen denkleme göre yapıldı. Bu denklemde simgelenen A_{Numune} DPPH' radikal çözeltisine numune

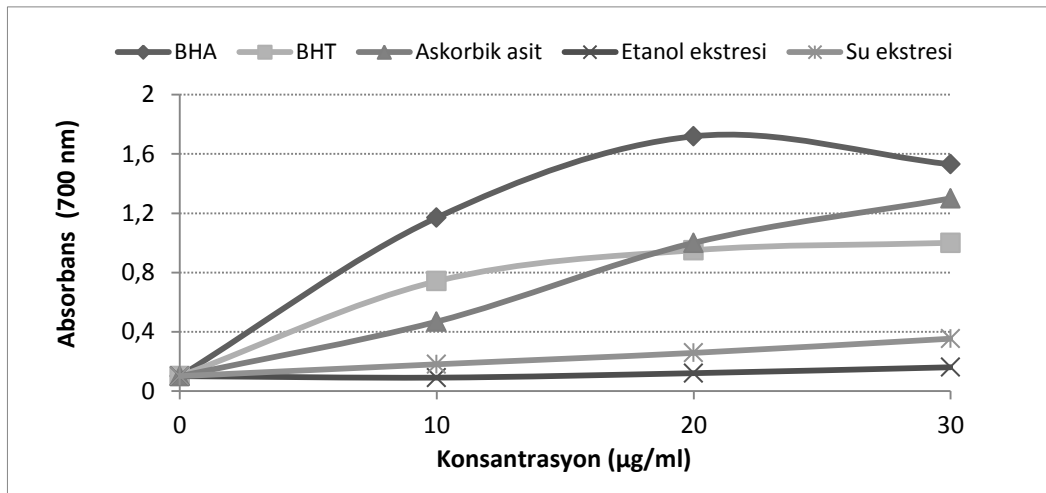
ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, A_{Kontrol} ise sadece DPPH• radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Standart olarak BHA, BHT ve askorbik asit kullanıldı.

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

Standart antioksidanlar ile ekstreler 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla BHA > askorbik asit > BHT > su ekstresi > etanol ekstresi şeklinde DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediği belirlenmiştir. Serbest radikal giderme yüzdeleri aynı sırayla %89.9 > %74.0 > %54.1 > %51.4 > %41.8 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre hem su ekstresi hem de etanol ekstresi önemli miktarda %50'ye yakın oranda serbest radikal gideren doğal antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür.

3.2. FRAP Metodu ile İndirgeme Kuvveti Çalışma Bulguları

İndirgeme kuvveti antioksidan çalışmalarında sıkça kullanılan bu yöntemde, hazırlanan test çözeltisinin açık sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı koyu tonlardaki renklere dönüşmektedir (Bursal, 2009). Renk koyulaşmasının etkisi ile artan absorbans miktarının ölçülmesi ile antioksidan aktivite miktarı hesaplanır.



Şekil 3.2. Ekstrelerinin ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve askorbik asit) farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/ml) FRAP metodu ile indirgeme kuvvetlerinin karşılaştırması

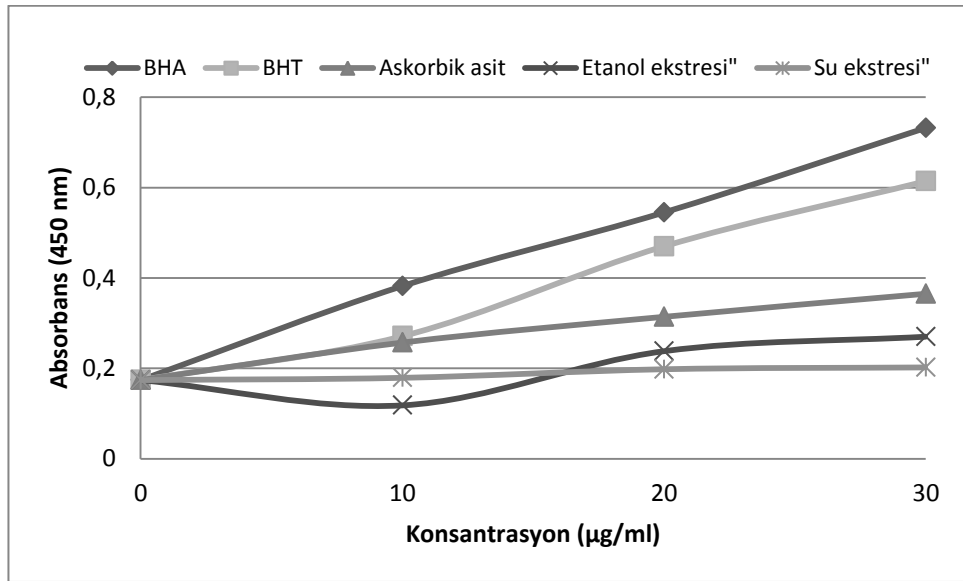
Çalışmada kullanılan su ve etanol ekstrelerinin indirgeme kapasitelerinin de standart olarak kullanılan antioksidanlar gibi ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı

olarak arttığı anlaşılmaktadır. Fakat bu artmanın standart antioksidanlar kadar fazla ve anlamlı olmadığı Şekil 3.2'den anlaşılmaktadır. Çalışma numunelerinin ferrik iyonlarını indirgeme kapasiteleri farklı konsantrasyonlarda (10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm'deki absorpsanları ölçülerek belirlenmiştir.

3.3. Kuprak Metodu ile İndirgeme Kuvveti Çalışma Bulguları

Inula graveolens (L.) Desf. liyofilize su ekstresinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, farklı konsantrasyonlarda (10-20 µg/ml) ekstre ihtiva eden numunelerin 450 nm'de absorpsanları ölçülerek hesaplandı. *Inula graveolens* (L.) Desf. bitkisi ekstresinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması Şekil 3.3'te gösterildi.

Bulgulardan da anlaşıldığı gibi askorbit asite benzer 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.



Şekil 3.3. *Inula graveolens* (L.) Desf. su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}), kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kuvvetinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

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: Retention time

^bParent ion (m/z): Molecular ions of the standard compounds (mass to charge ratio)

^cR²: coefficient of determination

^dRSD: relative standard deviation

^eLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/Limit of quantification

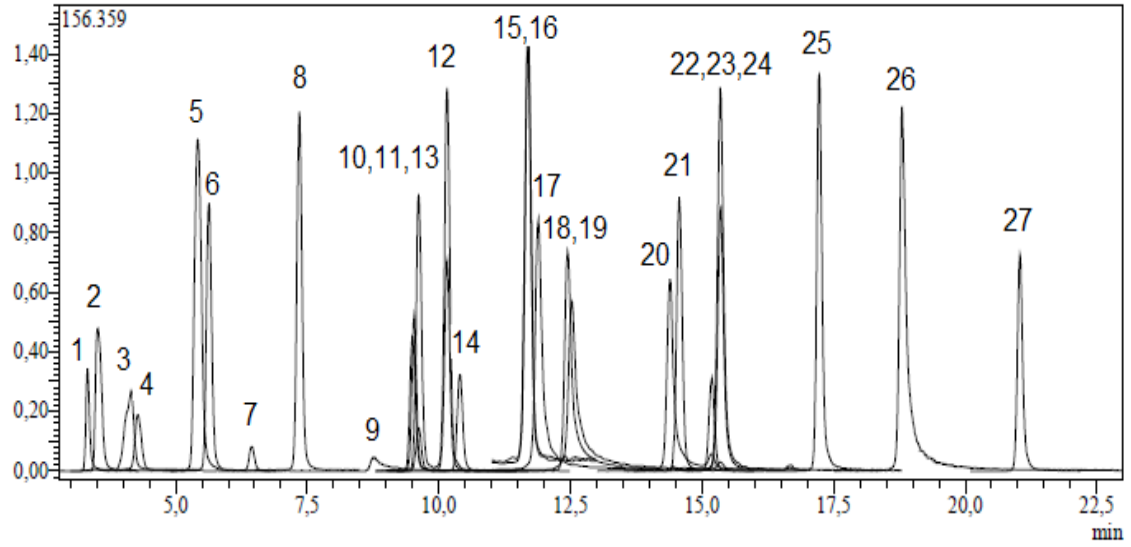
^fU (%): Percent relative uncertainty at 95% confidence level (k=2).

^g Values in µg/g (w/w) of plant methanol extract

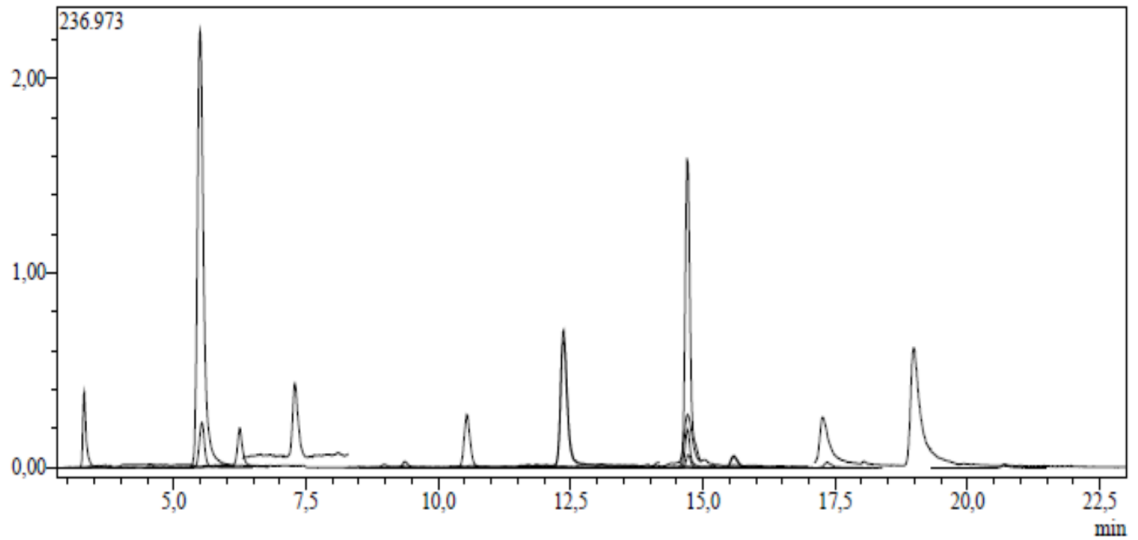
^hN.D: not detected.

3.4. LC-MS/MS ile Fenolik İçerik Analizi

Inula graveolens (L.) Desf. bitkisi etanol ekstresinin fenolik 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.



Şekil 3.4. UHPLC-ESI-MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin kalibrasyon kromatogramları



Şekil 3.5. UHPLC-ESI-MS/MS ile *Inula graveolens* (L.) Desf. ekstresinin kromatogramları

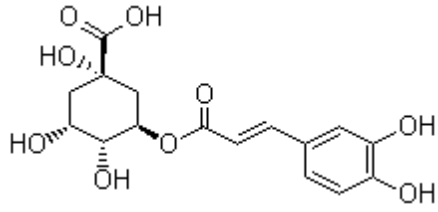
Inula graveolens (L.) Desf. bitkisine ait etanol ekstrelerin fenolik içeriklerinin analizi için kullanılan bileşiklere ait kromatogramlar Şekil 3.4’te verilmektedir. Aynı yöntem kullanılarak numunemizden hazırlanan ekstre cihaza verilmiş ve Şekil 3.5’deki kromatogramlar elde edilmiştir.

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

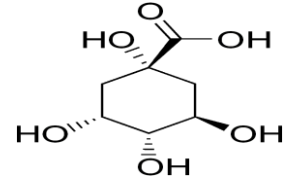
Çizelge 3.2. *Inula graveolens* (L.) Desf. bitkisi fenolik bileşiklerinin kantitatif sonuçları

Konsantrasyon (ppb)		
No:	Bileşik	Miktarı (ppb)
1	Chlorogenic acid (klorojenik asit)	2167±106
2	Quinic acid (Kuiniik asit)	845±41
3	Hyperoside (Hiperosit)	146±7
4	Protocatechuic acid (Protokataşik asit)	141±7
5	Quercetin (Kuersetin)	118±8
6	4-OH-benzoic acid (4-OH-benzoik asit)	63±3
7	Hesperetin (Hesperidin)	58±3
8	Salicylic acid (Salisilik asit)	56±3
9	p-Coumaric acid (p-kumarik asit)	51±3
10	tr-caffeic acid (kafeik asit)	45±2

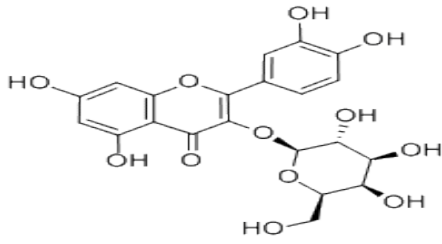
Çizelge 3.2’den anlaşıldığı gibi *Inula graveolens* (L.) Desf. bitkisinin yapısında standart olarak kullandığımız 27 fenolik bileşik içerisinde en fazla klorojenik asit (chlorogenic acid), kuiniik asit (quinic acid), hiperosit (hyperoside) ve protokateşik asit (protocatechuic acid) fenolik bileşikleri tespit edilmiştir.



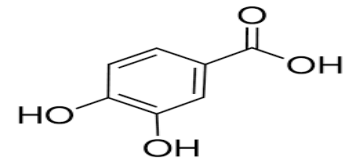
Chlorogenic acid



Quinic acid



Hyperoside



Protocatechuic acid

Bu fenolik bileşiklerden klorojenik asit, kuinik asit, hiperosit ve protokateşik asit kimyasal yapıları gösterilmiştir.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Kronik hastalıkların, DNA hasarlarının, mutasyonların, karsinogenezin azaltılması, patojenik bakteriyel gelişiminin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde serbest radikal gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmanın temel amacı çalışma bitkisinin farmasotik değerinin ön plana çıkarılması, antioksidan aktivitesinin belirlenerek terapik potansiyelinin tespit edilerek doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Son zamanlarda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla sayıda çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoit, flavonoit ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve bu bileşiklerin herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır.

Sıklıkla kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin bulunmasından sonra araştırmalar tamamen bitkisel orijinli antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin vd., 2011).

Antioksidan aktivite çalışmaları, doğal bitkilerin veya onlardan saflaştırılan etken maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması çalışmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Antioksidan aktivite belirleme metotları, toplam indirgeme kapasitesinin araştırılması, metal şelatlama aktivitesi, serbest veya iyonik radikallerin giderilmesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin, 2007).

Antioksidan kapasite tayinlerinde doğru yöntemi seçmek çok önemlidir. Antioksidanın hidrofilik veya lipofilik olması seçeceğimiz yöntemin belirlenmesinde önemli bir kriterdir. DPPH yalnızca organik ortamda çözülebilir (özellikle alkol ortamında), sulu ortamda çözünmez. Bu hidrofilik antioksidanların rolünün yorumlanmasında önemli bir sınırlamadır.

Yiyeceklerin antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan bileşenlerinin bilinmesi tıp ve beslenme uzmanlarının olduğu kadar sağlık ve besin alanındaki araştırmacılarında ilgi alanıdır. Besinlerin bileşenlerinin kompleksliği nedeniyle her bir antioksidan bileşiğin izole edilmesi ve tek başına tayin edilmesi hem pahalı hem de verimsizdir. Bir

karışımdaki antioksidan bileşiklerin muhtemel sinerjik ilişkileri de dikkate alındığında total antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemler önem kazanmaktadır.

Serbest radikallerin insan sağlığına olan zararlı etkilerini önlemek için tıp, gıda ve eczacılık sektörlerinde antioksidan maddelerin kullanılma düzeyleri gittikçe yaygınlaşmaktadır. Antioksidan maddelerin serbest radikalleri giderme aktiviteleri çok yüksektir. Çeşitli endojen ve eksojen nedenlerle serbest radikaller meydana gelmekte ve özellikle gıda sanayinde ürünlerde lipit peroksidasyonuna neden olarak ürünün sağlık kalitesini düşürmektedir.

Son yıllarda serbest radikallerin giderilmesini ölçmek ve yeni doğal antioksidan kaynakları keşfetmek için birçok antioksidan yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en sık kullanılanlar; tiyosiyanat yöntemi, metal iyonları indirgeme kapasitesi (FRAP ve Cuprac), DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺ katyon radikali giderme aktivitesi, DMPD⁺ giderme aktivitesi, PMS-NADH-NBT sistemi, süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi metotları kullanılmaktadır. Bu antioksidan metotlar uygulama kolaylığı, hassaslıkları ve analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği gibi avantajlardan dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bursal, 2009).

Antioksidan aktivite tayin metotları, bitkilerin ve bitkilerden saflaştırılan etken maddelerin biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın olarak kullanılmaktadır (Bursal ve Köksal, 2011). Bu çalışmamızda da antioksidan aktivite metotlardan DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP metoduna göre ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kapasitesi ve Kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi düzeyleri belirlenmiştir.

DPPH metoduna göre; kullanılan serbest radikal DPPH^{*} (1.1-difenil 2-pikril hidrazil) 517 nm'de absorbans veren organik yapılı bir maddedir. Bu serbest radikal antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek, radikal olmayan DPPH-H molekülüne dönüşmektedir. DPPH serbest radikalleri ortamda azaldığı için absorbans miktarında azalmalar oluşmakta ve bu olaydan faydalanarak antioksidan aktivite hesaplanabilmektedir.

Çalışma sonuçlarımıza göre ekstraktlar ile standart antioksidanlar 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla BHA > askorbik asit > BHT > su ekstresi > etanol ekstresi şeklinde DPPH^{*} serbest radikallerini giderdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre su ekstresi (%51.4) ve etanol ekstresi (%41.8) önemli miktarda serbest radikal gideren

doğal antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur. Daha önce yapılan farklı DDPH serbest radikali giderme aktivitesi çalışmalarındaki *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteini* Afan. (Kanbur, 2012) gibi kaynaklarına göre çalışma bitki materyalimiz olan *Inula graveolens* (L.) Desf. benzer aktiviteler sergilemiş olduğu tespit edilmiştir.

FRAP metoduna göre indirgenme kapasitesi tayini, antioksidan maddelerin elektron transferi yaparak indirgeyici özellikler göstermesi esasına dayanmaktadır. İndirgeyici antioksidanlar, oksidan maddeleri indirgerler ve bunların zararlı etkilerini azaltırlar. Çalışmada kullanılan *Inula graveolens* (L.) Desf. su ve etanol ekstralarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve askorbik asit kadar belirgin ve anlamlı olmasa da orta derecede olduğu anlaşılmaktadır.

CUPRAC metoduna göre indirgenme kapasitesi tayini de gerçekleştirilmiş olup, *Inula graveolens* (L.) Desf. yapraklarından elde edilen su ve etanol ekstralarının kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi standart antioksidanlar gibi artan konsantrasyonu ile arttığı tespit edilmiştir. Etanol ekstralarının indirgeme gücü standart antioksidan bileşiklerden az olmakla birlikte, askorbik asite yakın olduğu ve dolayısıyla antioksidan özelliğinin yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

LCMS-MS analiz sonuçlarına göre fenolik içerik analizi yapılmıştır. En fazla klorojenik asit (chlorogenic acid), kuinik asit (quinic acid), hiperosit (hyperoside) ve protokateşik asit (protocatechuic acid) bileşikleri tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları polifenolik yapıdadır. Bu kimyasal yapılarında bulunan aromatik halkalardaki fenol gruplarından dolayı elektron vererek radikalleri gidermesinden dolayı antioksidan özellikler göstermiştir.

Çalışmada incelenen bitki yerel olarak tedavi amaçlı kullanılmakla beraber, üzerinde yeterince klinik çalışmalar yapılmamış olması bu bitkinin kimyasal özelliğinin ve biyolojik etkilerinin tam bilinmemesi nedeniyle araştırmaya açık bir alan olduğu düşünülmektedir. Literatürde yapılan araştırmalarda çalışma materyali olan *Inula graveolens* (L.) Desf. bitkisi ile ilgili daha önce yapılan fenolik içerik analizi ve antioksidan aktivite tayini çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bu nedenle sonuçlar literatüre katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akkuş, İ. 1995. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya.
- Akpoyraz, M., Durak İ.,1995. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)*, 48, 253-262.
- Aksoy, Y. 2002. Antioksidan mekanizmada glutasyonun rolü. *Klinik Tıp Bilimleri*, 22, 442-448.
- Aruoma, O.I., Cuppett, S.L. 1997. Antioxidant methodology in vivo and in vitro concept. AOCs Press, Champaign, Illinois, p 241. Dawn, Bm, Allan, Dm, Colleen, Ms., ‘Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach’, Lippincott Williams & Wilkins Baltimore, Maryland.
- 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. 1995. Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 12(8), 475-480.
- Aydemir, B., Karadağ Sarı, E. 2009. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
- Biçim, G., 2013. Oksidatif stres ve antioksidan kapasite ile ilişkili gen polimorfizimlerinin değişik yöntemlerle belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- Boğa, R., 2014. Muş ilindeki saplı meşe (*Quercus robur subsp.pedun culiflora*) yaprak ve palamudu ile bu ağaçtan elde edilen Gezo pekmezinin antioksidan aktivitelerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muş Alparslan Üniversitesi, Muş.
- 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., Köksal, E. 2011. 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.
- 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.
- Burtis, C., Ashwood, E. 1999. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Cheeseman K.H., Slater, T.F. 1993. An introduction to free radical biochemistry, *British Medical Bulletin*, 49, 481-493.
- Cross, C.E., Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M., Harmon D., 1987. Oxygen radicals and human disease, *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.
- 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*, 50(4-5), 279-289.
- Davis, P.H., 1978. Flora of Turkey and the Aegean Island, V, Edinburgh University Press, s. 54-73.
- Derviş, E. 2011. Oral Antioksidanlar. *Dermatoz*, 2(1), 263-267.
- Diken, M.E. 2009. Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan İçerikleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Ercan, S. 2008. Doğumsal kalp hastalığı olan çocuklarda total oksidan (TOS) ve antioksidan seviye (TAS) ile oksidatif stres indeks (OSİ) düzeyleri. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Ertas, A., Boga, M., Yılmaz, M.A., Yesil, Y., Tel, G., Temel, H., Hasimi, N., Gazioglu, I., Ozturk, M., Ugurlu, 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.
- Fantel, A.G. 1996. Reactive oxygen species in developmental toxicity. Review and hypothesis. *Teratology*, 53, 96-217
- Gutteridge, J.M.C. 1989. Iron and oxygen: A biologically damaging mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica Suppl.*, 361, 78-85.
- Gülçin, İ. 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa, *Amino Acids*, 32, 431-438.
- 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.

- Gümrükçüoğlu, A. 2002. Fonksiyonel grup taşıyan monodispers poli(glisidil metakrilat) mikroküreleri ile sıçan kanında in vitro fagositik aktivitenin ölçülmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Günaldı, M. 2009. Kan selenyum düzeyi ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin akut miyokart enfarktüsü gelişimi üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutritional Review*, 52, 253-265.
- Halliwell, B. 1996. Antioxidant in human health and disease, *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Harnafi, H. Amrani S 2008. Spectrophotometric methods for determination of plant polyphenols content and their antioxidant activity assessment: an overview". *Pharmacognosy Reviews* 2, 20-22.
- URL 1: http://www.medscape.org/viewarticle/432384_5 , erişim Tarihi: 22.01.2013
- 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.
- Kanbur, H. 2012. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin mukayesesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan Üniversitesi, Erzincan.
- 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.
- Kılınç, A. 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110-118.
- Koca, N., Karadeniz, F. 2005. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Koç, E., Üstün, A.S. 2008. Bitkilerde protein kinazların rolü. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20, 25-34.
- Köksal, E., Bursal, E., Aggöl, A.G., Gülçin, İ. 2012. Purification and characterization of peroxidase from sweet gourd. *International Journal of Food Properties*,15 (5), 1110-1119.
- Langseth, L.1995., Oxidants, Antioxidants and disease prevention, ILSI (International Life Sciences Institute), p24, Brussels, Belgium.
- Macro, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Manglano, E. 1993. *Phytochemistry*, 33, 875,

- Memişoğulları, R. 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Mercan, U. 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 91-96,
- Modanlıoğlu, Ş.N. 2012. *Inula peacockiana* (Aitch. & Hemsl.) krovin türünün farklı ekstralarında antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Mortaş, M. 2012. Sakki elması (*Malus communis* L.)'nın meyve ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktivitelerinin mukayesesi” Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan Üniversitesi, Erzincan.
- Müftüoğlu, O. 2003. “Yaşasın Hayat.” Doğan Kitapçılık, İstanbul.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Nordberg, J., Arner, E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.
- Özdemir, Ç. 2011. Superoksit dismutaz enziminin nardan (*Punica granatum* L.) saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Stadtman, E.R. 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597-604.
- Stevenson, D.E., Hurst, R.D., 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2900-2916.
- Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U. 2000. Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1, 52-58.
- Temple, N.J. 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers, *Nutritional Research*, 20, 449-459.
- Velioğlu, S. 2000. Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. *Gıda*, 25(3): 167-176.
- Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G., Maxwell, S.R.J. 1992. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytic Chemistry Acta*, 266, 265-277.
- Yalçın, A. 1992. Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, 4, 40-43.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32.
- Zhou, B.N., Bai, N.S., Lin, L.Z., Cordell, G.A. 1993. Sesquiterpene lactones from *Inula britannica*. *Phytochemistry*, 34, 249-252.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Muş'ta doğdu. İlköğrenimini, orta ve lise öğrenimini Muş'ta tamamladı. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2001 yılında mezun oldu. 2011 yılında, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Evli ve iki çocuk babasıdır.