

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ OTU) BİTKİSİNİN
ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARININ İN VİTRO
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Sema İMAMOĞLU

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL (YTÜ)

İSTANBUL, 2010

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ OTU) BİTKİSİNİN**
ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARININ İN VİTRO
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Biyolog Sema İMAMOĞLU

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL (YTÜ)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. İnci ARISAN (YTÜ)

:Yrd. Doç.Dr. Zerrin ÇALIŞKAN (YTÜ)

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. SERBEST RADİKALLER	2
2.1 Serbest Radikallerin Oluşumu.....	3
2.1.1 Serbest radikal oluşumunu etkileyen endojen faktörler:.....	3
2.1.2 Serbest radikal oluşumunu etkileyen eksojen faktörler:	4
2.2 Serbest Radikallerin Sınıflandırılması	5
2.2.1 Reaktif oksijen türleri	5
2.2.2 Reaktif azot türleri	6
2.3 Oksijen Kaynaklı Radikaller	6
2.3.1 Süperoksit Radikali (O ₂ •).....	6
2.3.2 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) ve Hidroksil Radikali (OH•).....	7
2.4 Azot Kaynaklı Radikaller.....	8
2.4.1 Nitrik oksit radikali (NO•)	8
2.5 Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu	10
2.6 Radikallerin etkileri	12
2.7 Radikal tepkimelerinin sona ermesi.....	13
3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA	14
3.1 Antioksidanların sınıflandırılması	14
3.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD).....	16
3.1.2 Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	16
3.1.2.1 Katalaz	17
3.1.2.2 Glutasyon peroksidaz	18
3.1.3 E vitamini (α -tokoferol).....	19
3.1.4 C Vitamini (askorbik asit).....	20
3.1.5 β- Karoten.....	21

3.1.6	Lutein	22
3.1.7	Fenolik Bileşikler	23
3.1.8	BHA (Bütillendirilmiş Hidroksianisol).....	26
3.1.9	BHT (Butillendirilmiş Hidroksitoluen).....	27
3.2	Antioksidanların sağlık için önemi	29
4.	ÇİRİŞ OTU (<i>Asphodelus aestivus</i> Brot.)	31
5.	MATERYAL ve METOD.....	36
5.1	Kullanılan Materyaller	36
5.1.1	Kullanılan Kimyasallar	36
5.1.2	Kullanılan Cihazlar	37
5.1.3	Kullanılan Materyalin Temin Edilmesi	38
5.1.4	Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	38
5.2	Antioksidan Tayin Metodları	39
5.2.1	Toplam flavonoid içeriğinin tayini	39
5.2.2	Toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin tayini	39
5.2.3	Antosiyanin tayini.....	40
5.2.4	Prolin analizi.....	40
5.2.5	İndirgeme Gücü	40
5.2.6	DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi	41
5.2.7	Metal Şelatlama Aktivitesi.....	42
5.2.8	Toplam antioksidan aktivite tayini metodu.....	43
5.2.9	ABTS ⁺ radikal süpürme aktivitesi	43
5.2.10	Nitrik oksit radikal süpürme aktivitesi.....	44
5.2.11	Süperoksit radikali süpürme aktivitesi.....	45
5.2.12	Hidrojen peroksit süpürme aktivitesi.....	45
5.2.13	Hidroksil radikali süpürme aktivitesi.....	46
5.2.14	DMPD ⁺ radikali süpürme aktivitesi.....	47
6.	SONUÇLAR	48
6.1	Toplam flavonoid içeriğinin tayini	48
6.2	Toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin tayini	48
6.3	Antosiyanin tayini.....	49
6.4	Prolin analizi.....	49
6.5	İndirgeme Gücü	49
6.6	DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi	50
6.7	Metal Şelatlama Aktivitesi.....	52
6.8	Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	53
6.9	ABTS ⁺ radikal süpürme aktivitesi	56
6.10	Nitrik oksit radikal süpürme aktivitesi.....	57
6.11	Süperoksit radikali süpürme aktivitesi.....	57
6.12	Hidrojen peroksit süpürme aktivitesi.....	58
6.13	Hidroksil radikali süpürme aktivitesi.....	59
6.14	DMPD ⁺ radikali süpürme aktivitesi.....	60

7.	TARTIŞMA	62
	KAYNAKLAR.....	64
	ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
e^{-}	Elektron
g	Gram
μg	Mikrogram
mg	Miligram
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
μmol	Mikromol
m	Metre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
sn	Saniye
%	Yüzde

KISALTIMA LİSTESİ

ABTS•	2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) radikali
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
CA	Kafeik asit
CAT	Katalaz
DMPD•	N-N_dimetil_1,4_fenilendiamonyumdiklorit radikali
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil serbest radikali
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	İndirgenmiş glutasyon
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
Na-KATPaz	Sodyum potasyum Adenozin trifosfaz
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolium
PG	Prostoglandin
PMS	Fenazin metasülfat
RNA	Ribonükleik asit
ROÜ	Reaktif oksijen ürünü
SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	Bütillendirilmiş hidroksikinon
TCA	TCA siklusu (Teikarboksilik asit döngüsü)
uv	Ultraviyole (mor ötesi)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1 Antioksidanların sınıflandırılması.....	15
Şekil 3.2 Enzimatik antioksidan sistemi (Altınışık 2000).....	17
Şekil 3.3 α –Tokoferol (Vitamin E).....	20
Şekil 3.4 Askorbik asit (vitamin C)	21
Şekil 3.5.1 β -karotenin yapısı.....	21
Şekil 3.5.2 β -karotenin bir peroksi radikali ile reaksiyonlaşması (Devlin, 1992).....	22
Şekil 3.6 Luteinin yapısı	23
Şekil 3.7.1 Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b)	24
Şekil 3.7.2 Flavonoidlerin kimyasal yapısı	25
Şekil 3.8 Bütillendirilmiş Hidroksianisol (BHA)'un yapısı.....	27
Şekil 3.9 Bütillendirilmiş Hidroksitoluen (BHT)'nin yapısı.....	27
Şekil 4.1 <i>Asphodelus aestivus</i> 'un farklı dönemlerdeki görüntüsü.....	35
Şekil 5.1 Koyu menekşe renkli olan DPPH radikalinin antioksidan madde ile redüklenen ve rengin açılma mekanizması	42
Şekil 6.1 <i>Asphodelus aestivus</i> Brot. ekstrelerinin indirgeme gücü.....	50
Şekil 6.2.1 Ekstrelerin 15 dakika inkübasyondan sonra DPPH radikalini temizleme aktivitesi	51
Şekil 6.2.2 Ekstrelerin 30 dakika inkübasyondan sonra DPPH radikalini temizleme aktivitesi	51
Şekil 6.2.3 Ekstrelerin 60 dakika inkübasyondan sonra DPPH radikalini temizleme aktivitesi	52
Şekil 6.3 Ekstrelerin değişen konsantrasyonda metal şelatlama aktivitesi	53
Şekil 6.4.1 İlk 24 saatin sonunda total antioksidan aktivitesi	54
Şekil 6.4.2 İkinci gün-48 saatin sonunda total antioksidan aktivitesi.....	54
Şekil 6.4.3 Üçüncü gün-72 saat sonunda total antioksidan aktivitesi.....	55
Şekil 6.4.4 Dördüncü gün-96 saat sonunda total antioksidan aktivitesi	55
Şekil 6.5 Ekstrelerin ABTS radikalini temizleme aktivitesi	56
Şekil 6.6 Ekstrelerin nitrik oksit radikal süpürücü aktivitesi	57
Şekil 6.7 Ekstrelerin süperoksit radikalini temizleme aktivitesi	58
Şekil 6.8 Ekstrelerin hidrojen peroksiti süpürme aktivitesi	59
Şekil 6.9 Ekstrelerin hidroksil radikalini temizleme aktivitesi	60
Şekil 6.10 Ekstrelerin DMPD radikalini temizleme aktivitesi	61

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Reaktif oksijen türleri ve formülleri.....	5
Çizelge 2.2 Reaktif azot türleri ve formülleri.....	6
Çizelge 2.3 Reaktif oksijen kaynaklarının neden oldukları hasarlar ve hastalıklarla ilişkisi...	12
Çizelge 5.1 Kullanılan Kimyasallar ve ürün kodları	36
Çizelge 6.1 <i>Asphodelus aestivus</i> Brot. yapraklarından elde edilen ekstrelerin toplam flavonoid, toplam klorofil ve toplam karotenoid içeriği	48

ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Biyokimya Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve deneyimleriyle bana yardım eden ve yönlendiren, zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e;

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. İnci ARISAN'a;

Çalıştığım bitkinin teşhisini yapan İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Tamer ÖZCAN'a;

Özel yaşamım ve deneysel çalışmalarım da sabırla bana yardım eden ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Bahar Dindar, Arş. Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ ve hocam Arş. Gör. Nurdagül ORHAN'a;

Her zaman olduğu gibi tezimin hazırlanması sürecinde de yanımda olan, desteğini ve hoşgörüsünü hiç esirgemeyen dostlarım ve arkadaşlarıma;

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili annem Gülfiye İMAMOĞLU ve babam Nazmi İMAMOĞLU'na, her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen canım ablam Sevim İMAMOĞLU ve biricik kardeşim Aylin İMAMOĞLU'na;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Git gide artan dünya nüfusu, şehirleşme, stres, endüstriyel kirlilikler, hazır gıdalar ve gıdalarda kullanılan sentetik katkı maddeleri kanser başta olmak üzere birçok hastalığın oluşmasına ve ilerlemesine neden olmaktadır. Yapılan birçok araştırma, bu hastalıkların oluşumuna ve ilerlemesine organizmada gerçekleşen kimyasal süreçlerin, özellikle oksitlenme reaksiyonları sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin sebep olduğunu göstermiştir. Gıdalarda kullanılan sentetik maddeler ve birçok çevresel etki serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Antioksidanlar, serbest radikallerle etkileşerek onların zararlı etkilerini yok etmektedir. Antioksidan etkiye sahip maddelerin daha çok, alifatik ve aromatik bileşik oluşturma yeteneğine sahip bitkiler tarafından üretildiği kabul edilmektedir.

Eski çağlardan beri gerek kırsal alanda gerekse şehirlerde, hastalıkların tedavisinde ve hastalıklardan korunmak için çeşitli bitki ve bitkisel ilaçlardan yararlanılmaktadır. Özellikle eskiden beri kullanılan bu bitkilerin, etkin maddeleri ve antioksidan aktiviteleri incelenmektedir. Bu araştırmalar tıp, kozmetik ve gıda sektöründe sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilir ve serbest radikallerin temizlenmesinde rol oynayan doğal antioksidanlar üzerine ilgiyi artmış ve bu konudaki çalışmalara hız verilmiştir.

Bu çalışmada *Asphodelus aestivus* Brot. bitkisinden elde edilen su, etanol, metanol ve aseton ekstraktlarından farklı parametreler çalışılarak bitkinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla indirgeme gücü, metal şelatlama kapasitesi, total antioksidan aktivitesi, DPPH[•] radikali, ABTS^{•+} radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit radikali, Hidroksil radikali, DMPD^{•+} radikali ve NO radikali süpürme aktiviteleri, antosiyanin, total klorofil ve total karotenoid, total flavonoid ve prolin içeriği parametreleri çalışıldı. Her bir parametre bazı standart antioksidanlarla (BHT, BHA, Askorbik asit, α -tokoferol ve Troloks) karşılaştırıldı. Çalışılan parametrelerde yapılan işlemler materyal ve metot kısmında özetle anlatıldı. Elde edilen bulgular, sonuçlar kısmında tablo ve şekiller yardımıyla açıklanarak bu konuda önceden yapılmış çalışmalar ve literatür desteğiyle karşılaştırılarak tartışıldı.

Anahtar Sözcükler: serbest radikal, antioksidan, *Asphodelus aestivus* Brot.

ABSTRACT

The Investigation of Different Extracts From *Asphodelus aestivus* Brot.'s In Vitro Antioxidant Activity

Gradually increasing world population, urbanization, stress, industrial pollution, fast food and synthetic additives used in food cause many illnesses especially cancer occur and deteriorate. Many researches carried out showed that the cause of these diseases' occurrence and deterioration are chemical operations taking place in organisms and especially free radicals occurring as a result of oxidation reactions. Synthetic additives used in food and many environmental effects trigger the formation of free radicals. Antioxidants remove harmful effects of free radicals by interacting with them. It is accepted that substances having antioxidant effects are mostly produced by herbs possessing aliphatic and aromatic compound formation capability.

Since ancient times, various plant and herbal medicine have been utilized for treating diseases and preventing them in both rural areas and cities. Especially, the active substances and antioxidant activities of these plants utilized for long periods have been examined. These researches have attracted more attention on natural antioxidants which can be used instead of synthetic antioxidants and have a role in the refinement of free radicals in medicine, cosmetic and food sector and have accelerated researches on this issue.

In this research, it is aimed to examine antioxidant activity by using varied parameters of water, ethanol, methanol and acetone extracts produced by *Asphodelus aestivus* Brot herb. With this aim we studied on parameters of reducing power, metal chelating capacity, total antioxidant activity, DPPH[•] radical, ABTS^{•+} radical, superoxide radical, hydrogen peroxide radical, hydroxyl radical, DMPD^{•+} radical, NO radicals scavenging activity, anthocyanin, total chlorophyll, total carotenoid, total flavonoid content and proline analyses. They were compared with some standard antioxidants (Troloks, BHT, BHA, Askorbik asit ve α - tokoferol). Operations done in the studied parameters are explained briefly in material and method section. Obtained findings are explained and discussed with tables and diagrams in the results section with the support of the studies done before and literature.

Keywords: Free radicals, antioxidants, *Asphodelus aestivus* Brot.

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi edici özellikleri, ilkel çağlardan beri bilinmekte ve kullanılmaktadır. İlk çağlarda faydası olduğu bilinen bazı bitkiler yaraların iyileştirilmesi için kullanılmıştır. Günümüzde ise hem kırsal alanda hem de şehirlerde çeşitli hastalıkların tedavisinde ve hastalıklardan korunmak için tıbbi tedavinin yanı sıra, bitkisel ilaçlardan yararlanılmaktadır. Bunun için her bölgeye ait geleneksel uygulamalar geliştirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1993 yılı raporlarına göre; insanların % 80'inin geleneksel ilaçlara güvendiği ve geleneksel tedavilerin büyük bir kısmını bitki özütlerini veya onların aktif bileşenleri kullanarak yaptıklarını ilan etmiştir. Tıbbi bitkilerle tedavi bir kültür ve geleneğe dayanmaktadır. Bu nedenle halk ilacı olarak kullanılan bitkiler üzerindeki araştırmalar önem kazanmış, bitkilerin sağlık açısından faydaları ve bu konudaki araştırmalar günden güne artmıştır (Gürhan ve Ezer 2004).

İlaçların yan etkilerinin olması, insanları daha az yan etkiye sahip olduğunu düşündükleri ve antioksidan aktiviteye sahip olabilecek bitkilerle tedaviye yöneltmiştir. Biyokimyasal ara ürünler ve stres sonucu oluşan serbest radikallerin; kanser, miyokard enfarktüs gibi birçok hastalığa neden olduğu tespit edilmiş, ve doğal antioksidanların günlük diyetle alınmasının hastalıkların oluşum riskini önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur. Özellikle bitkisel metabolizmalardaki vitaminlerin ve uçucu yağların bileşimindeki terpenlerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Birçok araştırmada bazı bitki türlerinin kanseri ve kardiovasküler hastalıkları önlediği bildirilmiş, bu bitkilerin kimyasal bileşenlerine bakıldığında yüksek düzeyde antioksidan aktivite gösteren polifenoller, vitaminler gibi maddeleri bolca içerdikleri tespit edilmiştir.

Bitkilerdeki antioksidan aktivite, ilk olarak 1950'lerde Chipault vd.'lerinin 32 baharat türünün antioksidan aktivitesini araştırmasıyla başlamış, sağlık açısından önemi anlaşıldıkça bu konudaki ilgi ve araştırmalar artmıştır.

Bu çalışmada Liliaceae familyasından *Asphodelus aestivus* (çiriş otu)'un antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. SERBEST RADİKALLER

Bilindiği gibi atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektrona sahip, yüklü veya yüksüz, oldukça reaktif ve stabil olmayan atomsal ya da moleküler yapılara serbest radikaller denir (Altınışık, 2000, Halliwell 1991). Bu çiftlenmemiş yapılarından dolayı aşırı derecede reaktiftirler, bu nedenle diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek zarar verirler.

Organizmada, serbest radikallerin zararlı etkilerini engelleyerek etkisizleştirilmesini sağlayan güçlü savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızıyla etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Ancak savunma azalır da bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı savunma gücünü aşarsa denge bozulur ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkar. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasar oksidatif stres olarak tanımlanır, prooksidan-antioksidan dengenin prooksidan yönüne değişmesiyle karakterize edilir (Halliwell 1984, Amanvermez 1997).

Radikaller hücre içinde, aerobik metabolizma sırasında sürekli oluşmakta ve belli patolojik durumlarda üretimleri artmaktadır. Stabil olmayan durumun yarattığı enerji, organik veya inorganik kimyasallar, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA gibi komşu moleküllerle reaksiyona girerek serbestleşir. Serbest radikaller, dış yörüngelerindeki elektron açığını reaksiyona girdiği komşu molekülden alırken, elektronunu kaybeden komşu molekül artık kararsız bir yapı haline geçmiş olur ve böylece yeni bir serbest radikal oluşmuş olur. Etkileşim böyle devam ederek sürekli serbest radikale dönüşüme neden olan bir reaksiyon zinciri (otokatalitik) başlar (Prior ve Cao, 2000).

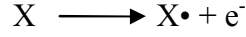
Serbest radikaller, organizmada normal olarak meydana gelen metabolik olaylar (oksidoreduksiyon reaksiyonları) sırasında oluştuğu gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Bileşiklerin parçalanmasıyla, elektron kaybetmesiyle veya ilave elektron almasıyla serbest radikaller oluşurlar.

1.Kovalent bağlı bir molekülün bölünmesi ve her parçasında elektronlardan birinin kalmasıyla

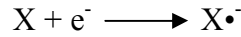
oluşan homolitik bölünme ile;



2. Molekülün e^- kaybetmesi, molekülün heterolitik bölünmesi ile;



3. Moleküle e^- transferi ile oluşmaktadır.



2.1 Serbest Radikallerin Oluşumu

Eşlenmemiş elektronlar biyolojik önemi olan pek çok atomda bulunabilir, sülfür, karbon, hidrojen, nitrojen veya oksijen kaynaklı olabilir. Diatomik oksijen iki tane eşlenmemiş elektrona sahip olduğundan zaten bir radikal durumundadır veya moleküler oksijen kolayca bir elektron kazanarak süperoksit ($O_2\cdot^-$) radikaline dönüşmektedir. Biyolojik sistemlerde önemli radikallerin çoğu oksijene dayanır. Özellikle hasta veya yaşlı hücrelerde radikal üretimi artmaktadır.

Serbest radikal oluşumunu etkileyen birçok çevresel veya metabolik faktörler bulunmaktadır.

2.1.1 Serbest radikal oluşumunu etkileyen endojen faktörler:

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri olsa da, metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

- Mitokondrideki elektron transport zinciri reaksiyonları,
- Endoplazmik retikulum (ER) 'daki oksidaz reaksiyonları,
- Ksantin oksidaz, dopamin β -hidroksilaz, D-amino asid oksidaz, urat oksidaz gibi enzimlerin reaksiyonları,
- Hücre zincirine bağlı NADPH oksidaz, prostaglandin (PG) sentezi ve lipooksijenazların etkinliği,
- Peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olaylar temel kaynaklardır.
- Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalın ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikalinin bir başka kaynağıdır.

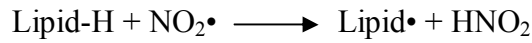
2.1.2 Serbest radikal oluşumunu etkileyen eksojen faktörler:

Eksojen faktörler yapılan bazı yanlışlar, hastalıklar veya çevre kirliliğinden kaynaklı olabilmektedir.

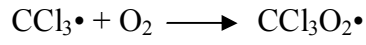
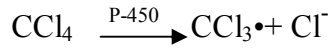
- Bilinçsiz yapılan aşırı veya yetersiz fiziksel egzersiz,
- Aşırı stres altında kalmak,
- Hücrelerin yaşlanması,
- Doku hasarı ve kronik hastalıklar (damar tıkanıklığı, kanser, kronik inflamasyon, iskemi gibi)
- Diyetel antioksidanların sağlanmasını olumsuz etkileyen koşullar (diyet, iştahsızlık, kolestaz, malabsorbsiyon vs.)
- Diyetel yanlışlar; aşırı alkol tüketimi, doymuş yağ asitlerince zengin beslenme, hayvansal proteinlerce zengin beslenme, aşırı kalorili beslenme, aşırı demir ve bakır alınması, koruyucu katkı maddelerinin aşırı tüketilmesi, az miktarda sebze ve meyve tüketilmesi, yiyeceklerin uygun olmayan koşullarda üretilmesi ve saklanması, yanlış yemek pişirme teknikleridir.
- Çevresel etkenler; sigara dumanı, hava kirliliğine (O₃, NO₂, SO₂) maruz kalmak, çevre kirleticileri (Endüstri atıkları, Asbest, Pestisitler), uv ışınları, radyasyon ve kimyasallardır (kozmetik).
- İlaçlar; antikanser ilaçlar (Adriamisin vs.), Glutatyon (GSH) tüketen ilaçlar (asetaminofen, kokain vs.) gibi.

Çevreden alınan toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini arttırmaktadır. Bu toksik maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler.

1. Alınan toksik maddenin kendisi serbest radikal olabilir. Örneğin kirli havadaki azot dioksit (NO₂•) gazı, bu gaz lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



2. Toksik madde serbest radikale metabolize olarak zararlı etki göstebilir. Kuru temizlemede kullanılan karbon tetraklorür (CCl₄), Endoplazmik retikulum (ER)'daki sitokrom p450 tarafından triklorometil serbest radikale (CCl₃•) dönüştürülür. Triklorometil serbest radikali de moleküler oksijenle (O₂) etkileşerek peroksil serbest radikali (CCl₃O₂•) oluşturur.



3.Toksik maddenin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelebilir.

4.Toksik madde antioksidan aktiviteyi düşürebilir. Örneğin; Parasetamol, karaciğerde sitokrom p450 tarafından üretilen glutatyonla reaksiyona giren bir ürün oluşturarak, sonuçta glutatyonun miktarını azaltır.

2.2 Serbest Radikallerin Sınıflandırılması

2.2.1 Reaktif oksijen türleri

Çizelge 2.1 Reaktif oksijen türleri ve formülleri

Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Süperoksit	$\text{O}_2\cdot$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksi	$\text{OH}\cdot$	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksi	$\text{ROO}\cdot$	Hipobromöz asit	HOBr
Alkoksi	$\text{RO}\cdot$	Ozon	O_3
Hidroperoksi	$\text{HOO}\cdot$	Singlet oksijen	$^1\Delta_g \text{ } ^1\text{O}_2$

2.2.2 Reaktif azot türleri

Çizelge 2.2 Reaktif azot türleri ve formülleri

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

2.3 Oksijen Kaynaklı Radikaller

2.3.1 Süperoksit Radikali (O₂•)

Aerobik organizmalarda serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Metabolizmada moleküler oksijenin %98'i oksidazlar yoluyla suya indirgerken kalan %2'lik kısım oksijenaz yoluyla potansiyel toksik reaktiflere dönüştürülür.

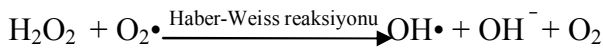
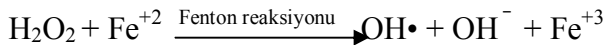
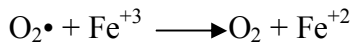
O₂• hem çevresel etkenlerle, hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla en çok oluşan radikaldir. Diğer radikallerin oluşması O₂• radikallerinin birikmesine bağlıdır. Oksijen radikallerinin fazla birikiminin neden olduğu etkilerin toplamı oksidatif stres olarak adlandırılır. O₂• radikali hem oksidan hem de indirgendir, adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler, sitokrom c'yi ise indirger. Moleküler oksijenin indirgenmesiyle oluşan ilk ürün süperoksit (O₂•) radikaldir ve çok güçlü oksidan bir moleküldür. O₂• spontan dismutasyon reaksiyonuna uğrayarak H₂O₂'i oluşturur. H₂O₂ gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen, hidroksil radikalının (OH•) oluşumuna yol

açabileceğinden dolayı önemli bir oksidandır. Ayrıca mikrobiyal canlılar için toksik özelliktedir. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ve suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla oluşabilir. (Akkuş, 1995)

İndirgeyici moleküller oksijene e^- verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşmuş olur. Çeşitli hidrogenaz ve oksidazların katalitik etkisiyle oluşurlar. Mitokondrideki enerji metabolizmasında tüketilen oksijenin %1-5'i süperokside dönüşür. Ayrıca fagositik lökositler çok fazla süperoksit üreterek fagozom içinde biriktirip, antibakteriyal savunma için kullanılmaktadırlar.

2.3.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ve Hidroksil Radikali ($OH\bullet$)

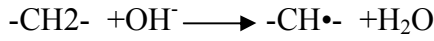
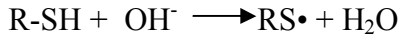
Sitoplazmadaki $O_2\bullet$ in başlıca kaynağı endoplazmik retikulum (ER)'daki detoksifikasyonu sağlayan sitokrom p450 enzim sistemidir. Çok toksik olmayan $O_2\bullet$, asıl etkisini daha güçlü oksijen metabolitlerinin açığa çıkmasına yol açarak gösterir. $O_2\bullet$ indirgenmesiyle H_2O_2 oluşur. H_2O_2 'in toksisitesinin büyük çoğunluğu, $OH\bullet$ radikali oluşturma potansiyelinden kaynaklanmaktadır. H_2O_2 membranları kolaylıkla geçebilme özelliği ve geçiş metallerinin (Fe / Cu) veya $O_2\bullet$ radikallerinin katalizör etkisiyle güçlü oksijen radikallerinin ($OH\bullet$) ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları). Hidroksil radikali, son derece reaktif oksidan bir radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısa olduğundan, oluştuğu yerde oksidatif hasara sebep olmaktadır (Akkuş 1995).



$OH\bullet$ radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücrel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. $OH\bullet$ radikali DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Ayrıca aromatik halkalı yapılara

katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşturabilmektedirler. Bu gibi reaksiyonlara katılabilen OH• radikali DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olabilmektedir. Oluşan hasar çok büyük boyutta olursa hücre koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir, sonucunda mutasyonlar veya hücre ölümleri meydana gelebilmektedir.

Hidroksil radikali, tüm bu reaksiyonların yanı sıra tioller ve yağ asitleri gibi değişik moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşumuna sebep olabilir.



Moleküler oksijen ideal terminal elektron akseptörüdür ve elektronlara karşı yüksek afiniteye sahiptir. Diğer güçlü elektron akseptörlerinin aksine bir katalizörle aktive edilmedikçe çok yavaş reaksiyon verir.

Süperoksit radikalının temizlenmesinde en etkili antioksidan Süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir, bunun yanında glutatyon, flavonoidler ve çeşitli polifenoller de etkilidir.

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla olduğu gibi serbest radikal reaksiyonlarını başlatma özeliğine sahiptir.

2.4 Azot Kaynaklı Radikaller

2.4.1 Nitrik oksit radikali (NO•)

Azot monoksit olarak da adlandırılan NO, son derece toksik ve renksiz bir gazdır. Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir. NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir.

NO'nin sitoplazmik guanilat siklaz enzimini aktive ettiği ve döz damar kaslarında gevşemeye neden olduğu 1970'li yılların sonlarından beri bilinmektedir. Konak savunması ve immunitiyi etkilediği gibi kan damar tonusu ve nöronal ileti de dahil bir çok fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca NO, sinir sistemi morfogenezinde ve sinapsların şekillenmesinde rol oynar, nörotransmitter salım ve gen ekspresyonunu düzenler. NO'nin aşırı üretilmesi halindeyse, çeşitli sinir sistemi hastalıklarında önemli nörotoksin olarak karşımıza çıkmaktadır.

Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında veya memeli dokularında L-argininden L-citrulin oluşurken, nitrik oksit sentaz enziminin aktivitesiyle NO açığa çıkmaktadır.

Reaktivitesi düşük olmasına karşın Fe, Cu, Co gibi metal içeren moleküller veya serbest radikallerle hızla tepkimeye girmektedir. Osidatif fosforilasyonda ubikinonredüktaz, glikolizde gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, TCA siklusunda cis-akonitaz gibi Fe içeren enzimleri inhibe etmektedir. Bu yüzden NO, düşük konsantrasyonda metabolizma için koruyucu ve regülatör etkilere sahip, yüksek konsantrasyonda ise oksijenle hızlı şekilde reaksiyona girmekte, oluşan reaktif ürünler ise biyomoleküllere zarar vermektedir.



Peroksinitritin direkt olarak proteinlerde hasar oluşturur ve parçalanmasıyla nitronyum iyonu (NO_2^+), nitrojen dioksit gazı ve $OH\bullet$ gibi toksik etkili bileşikler oluşur. Yani nitrik oksitin toksisitesi $O_2\bullet$ bağlı ve peroksinitritinden kaynaklanmaktadır. (Altınışık 2000)

Metabolizmada oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır.

Peroksinitrit radikalini temizleme aktivitesi üzerinde yapılan çalışmalarda; flavonoidler, kateşinler, hidroksiguanidinler, indirgenmiş nikotinamid nükleotidi (NADPH) ve ürik asidin etkili olduğu görülmüştür.

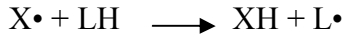
2.5 Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu

Biyolojik sistemlerde poliansatüre yağ asitlerinin serbest radikallerle oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu reaksiyonlar zinciri olup, daha ileri peroksidasyonu başlatan serbest radikal kaynağıdır. Serbest radikallerin sebep olduğu toksik etkinin göstergesi olarak, lipid peroksidlerinin düzeyleri ölçülerek oksidan radikal hasarı belirlenir.

Lipid peroksidasyonu, üç fazdan oluşur;

1. Başlangıç;

Serbest radikalın etkisiyle poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu çıkarılması ile yağ asidi zincirinin lipid radikal özelliği kazanmasıyla zincir reaksiyon başlar. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunu başlatan bu radikalın süperoksit anyonu ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve moleküler bir dizi değişikliğe uğrar.

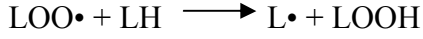
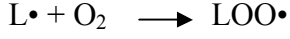


2. Yayılma;

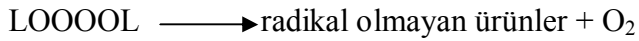
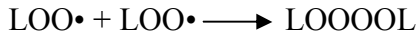
Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle (O₂) reaksiyonu sonucu lipid peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali (LOO•) de zar yapısındaki diğer yağ asitleriyle reaksiyonlaşarak yeni lipid radikallerinin (L•) oluşmasına yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedir. Yeni oluşan lipid radikali tekrar bir oksijen molekülüyle birleşerek peroksit radikali oluşturur ve tüm reaksiyonlar zincirleme şekilde devam eder.

Lipid hidroperoksitlerin parçalanmasıyla da lipid alkoksi radikalleri gibi çeşitli toksik ürünler (alkoller, ketonlar, aldehitler, eterler) ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda lipid peroksidasyonunun miktar tayini, parçalanmayla oluşan gazların (etan, bütan, pentan) soluk

havasında belirlenmesiyle yapılmaktadır (Amanvermez 1997).



3.Sonlanma;



Membran hasarının nasıl onarıldığı konusu tam olarak açıklanamamıştır. Fakat ön görülen mekanizma şu şekilde gerçekleşmektedir; fosfolipaz A enzimi peroksitlenmiş yağ asitlerini membrandan hidroliz eder, böylece peroksitlerin radikallere yıkımını önler ve hasarlı membran fosfolipidlerini temizler.

Lipid peroksidasyonu farklı yollarla hücre hasarı oluşturmaktadır. Örneğin, zar lipid yapısında değişikliklerle işlevinin bozulmasına sebep olmakta, oluşan radikallerin enzim ve hücre bileşenlerini etkilemesiyle zarar vermekte ve son ürünlerin (aldehitler vs.) toksik etkilere sebep olmasıyla da hasar oluşturmaktadır. Peroksidler, lipid hidroperoksidler ve aldehitler doğrudan membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler de diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir. Bu tür zararlarıyla lipid peroksidasyon indikatörleri, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olabilirler. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması sebebiyle oluşan reaksiyonlar membran bileşenlerine zarar vererek, mozaik yapısını ve permeabilitesini etkiler.

Lipid peroksidasyonu, membran deformasyonuna, membranın elektrofizyolojik özelliklerine, reseptör yapılarına, Na-K ATPaz'ın ATP'ye afinitesini modifiye etmesine ve biyokimyasal özelliklerin bozulmasına sebep olduğu ortaya çıkmıştır. Membran lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynakları ile stimule edilmekte ve redoks yapan metallerin (Fe, Cu) varlığında artmaktadır.

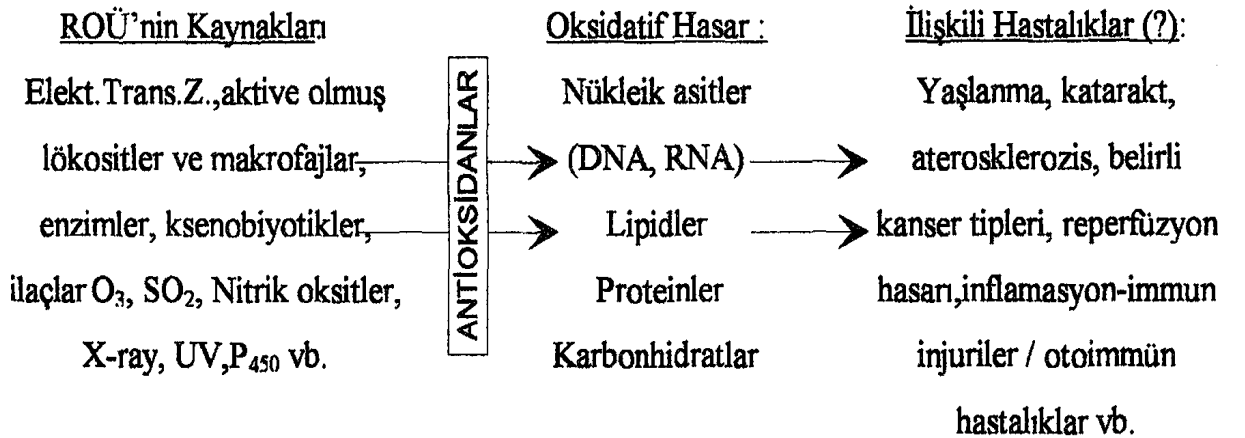
2.6 Radikallerin etkileri

Patolojik durumlarda normalden fazla miktarda radikal oluşturulması veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküllerle etkileşerek hücrede yapısal veya fonksiyonel bozukluğa neden olmaktadır. Radikaller oksidatif atağa meyilli olan nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit (DNA), aminoasitler, proteinler (enzimler ve kollajen), karbonhidratlar, nörotransmitterler, hücre membran bileşenleri (yağ asitleri, lipidler) gibi bütün hücre elemanlarında hasara yol açmaktadır.

Serbest radikallerin yol açtıkları tahribatlar;

- DNA tahribatı,
- Nükleotid yapılı ko-enzimlerin yıkımı,
- Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, (hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi)
- Protein ve lipidlerde kovalent bağlar
- Enzim aktiviteleri ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- Proteinlerin tahrip olması ve protein turnoverının artması,
- Lipid peroksidasyonu ile zar yapısı ve fonksiyonunun değişimi, metabolit ve iyon transportunda bozulma,
- Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması
- Steroid ve yaşlılık pigmentlerinin birikimi
- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon reaksiyonlarının bozulması kapilerdeki atrofik değişikliklerin oluşması.

Çizelge 2.3 Reaktif oksijen kaynaklarının neden oldukları hasarlar ve hastalıklarla ilişkisi.



2.7 Radikal tepkimelerinin sona ermesi

Oluşan radikallerin antioksidanlarla indirgenmesi (detoksifikasyon), radikallerin birbirleriyle tepkimeye girmesi veya ortamda tepkimeye girecek bileşik kalmamasıyla radikal tepkimeler sona ermektedir.

3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen, serbest radikallerle reaksiyona girerek oto-oksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini ve zarar vermesini önleyen kimyasal maddelerdir.

Antioksidanların en önemli özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada elektronlarını kaybetmeler de radikal haline gelmemeleridir.

Antioksidan savunma 4 şekilde etki eder,

- 1) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek, onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirmesiyle etki eder. Örn: Antioksidan enzimler.
- 2) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azalatrak veya inaktif şekle dönüştürerek etki eder. Örn: Vitaminler, flavanoidler.
- 3) Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak, oluşturdukları zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyerek etki eder. Örn: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller.
- 4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasıyla etki etmektedir.

Bir maddenin antioksidan olabilmesi sahip olması gereken özellikler;

- Antimutajenik olmaları
- Antikarsinojenik olmaları
- Antiaging olmalarıdır.

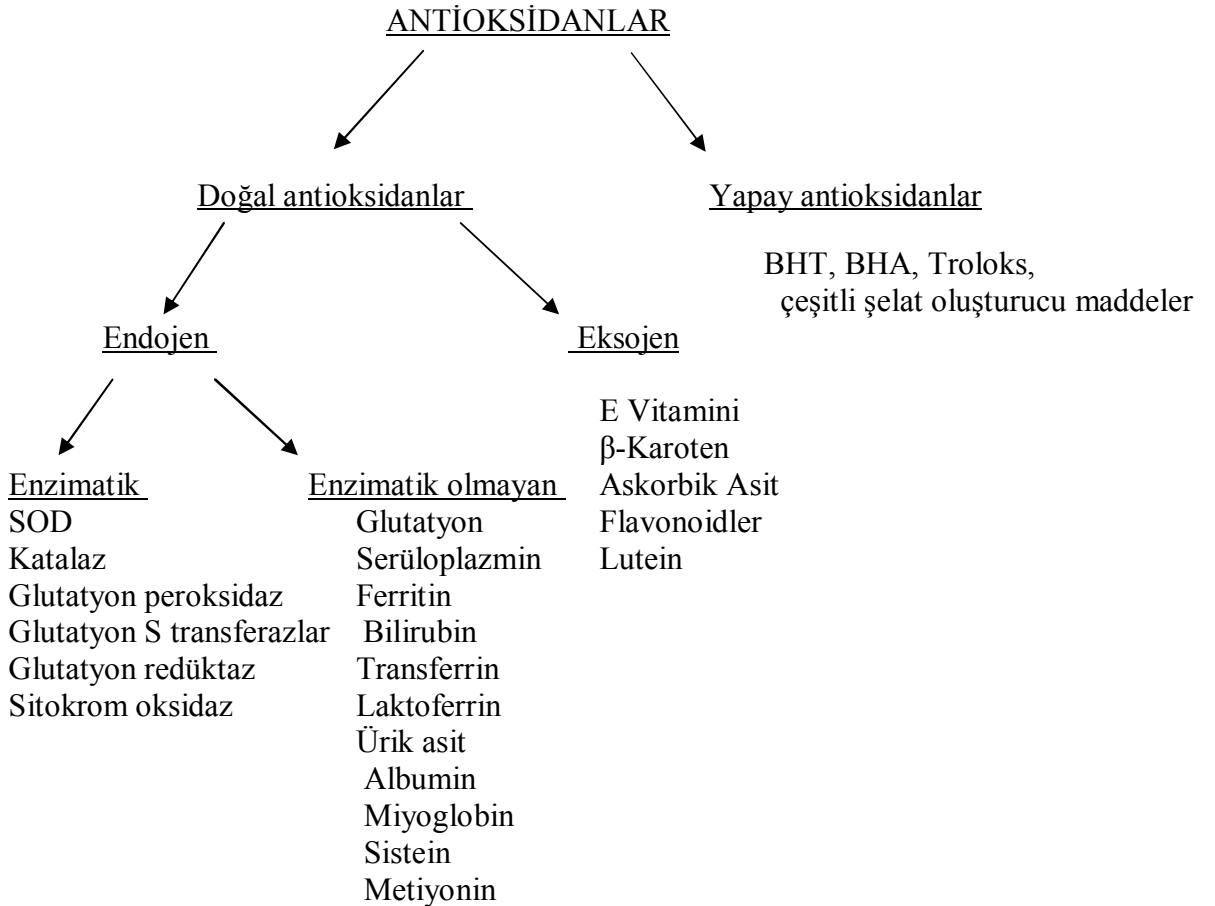
3.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar vücut tarafından üretilbildikleri gibi dışarıdan gıdalarla da alınabilirler.

Antioksidanları öncelikle doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar (ilaçlar) şeklinde sınıflandırmak daha doğru olacaktır. Doğal antioksidanlar, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen antioksidanlar, enzimler ve enzim olmayanlar şeklinde sınıflandırılabilir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-

Px) ve hidroperoksidaz enzimlere; melatonin, seruloplazmin, transferin ve miyoglobin ise enzim olmayanlara örnek olarak verilebilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilirler.

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır. Vitamin olan eksojen antioksidanlar; α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, askorbik asit (vitamin C) ve folik asit (folat) örnek olarak verilebilir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri örnek olarak verilebilir. Gıdalardaki yapay antioksidanlar ise; butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianisol (BHA), Troloks, sodyum benzoat ve propilgallattır.



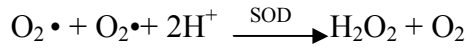
Şekil 3.1 Antioksidanların sınıflandırılması.

3.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD dismutasyondan sorumlu olup, hücre içi etkinlik gösteren enzimatik bir antioksidandır.

Süperoksit radikalleri ($O_2\bullet$) açığa çıktığı hücre bölümünden uzak noktalara rahatlıkla difüze olabilir. Ancak bu difüzyon SOD enzimi tarafından sınırlandırılır.

Süperoksit radikalının H_2O_2 ye dismutasyonunu katalizler. Cu, Zn, Mn aktivatörleridir.



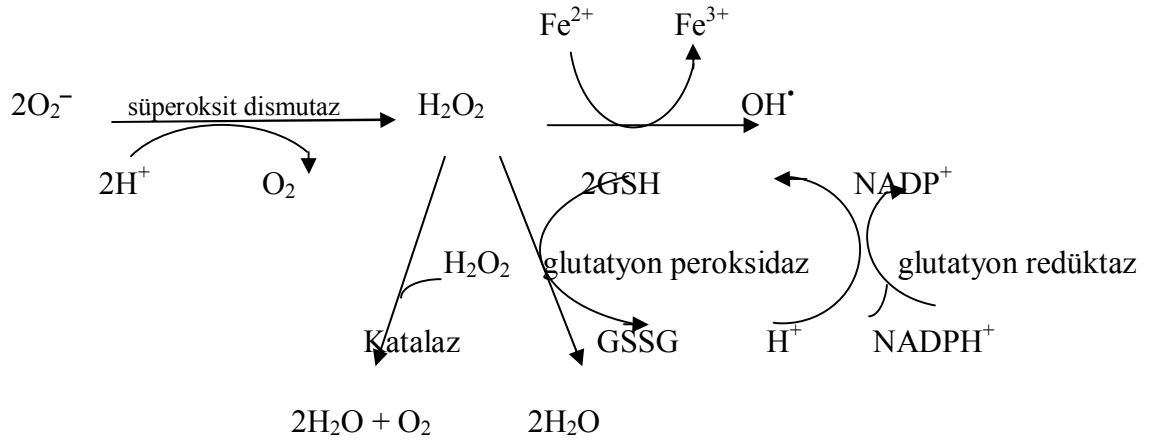
SOD enziminin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri, süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve dokuda moleküler O_2 artışıyla artar. SOD'ın ekstrasellüler aktivitesi ise çok düşüktür.

3.1.2 Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hücre içerisinde oluşan organik peroksit ürünlerini (R_2O_2), katalaz ise H_2O_2 'in dismutasyonundan sorumlu, enzimatik antioksidanlardır.

Dokulara göre biyolojik önemleri ve aktiviteleri değişmektedir. Örneğin; GSH-Px beyinde yoğun olarak bulunmakta, CAT ise yapısındaki Fe içerikli Hem-grubundan dolayı, kanda ve eritrositlerin yoğun olarak bulunduğu kalp kası, kemik iliği, böbrek ve karaciğerde yoğun olarak bulunmaktadır. Bu enzimler buldukları dokuları radikallere karşı koruyan antioksidanlardır (Altınışik 2000).

Tüm enzimlerin aktivitesi; serbest radikallerin sentez ve yıkılma hızına, diyetle eser elementlerin (Mn,Se,Fe,Zn,Cu) alınmasına bağlıdır.

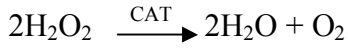


Şekil 3.2 Enzimatik antioksidan sistemi (Altınışık 2000)

3.1.2.1 Katalaz

Solunum yapan tüm organizmalarda bulunan ve iki önemli fonksiyonu olan bir enzimdir.

1. Zehirsizlenme reaksiyonu; H_2O_2 'in oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda, H_2O_2 'in O_2 ve H_2O 'ya ayrıştırılmasıyla ortamdan uzaklaştırma reaksiyonudur (katalitik tepkime),



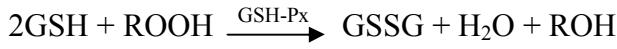
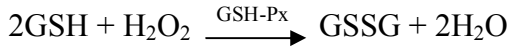
2. Peroksidaz aktivitesi; H_2O_2 'in oluşum hızının düşük olduğu durumlarda, peroksidin parçalanmasıyla oluşan metanol, etanol, formik asid veya fenollerin yükseltgenmesi reaksiyonudur.



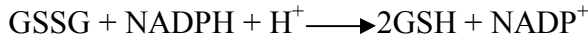
Oksidatif hasara çok kolay maruz kalan eritrosit gibi (hem ve Fe içeren) hücrelerde CAT aktivitesi yüksektir. CAT hidrojen peroksid, metil peroksid gibi küçük moleküllere etki ederken lipid hidroperoksidlerine etki edemez.

3.1.2.2 Glutasyon peroksidaz

Glutasyon peroksidaz sitozolde bulunan 4 selenyum atomu içeren, tetramerik yapıdadır. Diyetle alınan Se, enzim aktivitesini modifiye eder. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), H₂O₂ ve lipid peroksidlerin indirgenmiş glutasyonu (GSH) harcayarak, su ve yükseltgenmiş GSSG oluşturmasını katalizleyen enzimdir.



Yükseltgenen glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin etkisiyle tekrar indirgenmiş GSH'a dönüşür. Bu reaksiyon pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'lerine bağımlıdır.



Glutasyon (GSH), bilirubin, ürik asit, albumin, seruloplazmin, hemoglobin, ferritin de yine endojen kaynaklı fakat enzimatik olmayan antioksidanlardır, etkinliklerini hücre içinde gösterirler (Altınışık 2000).

Metabolik antioksidan savunma için enzimatik antioksidan üretiminde artış olması beklenir. Fakat bu savunma sistemlerinde yaşa ve hücre hasarına bağlı olarak değişiklikler ve azalmalar gözlenmektedir. Bundan dolayı da dışarıdan antioksidan takviyesi yapmak şarttır.

Askorbik asit, α-tokoferol, β-karoten ve polifenoller gibi maddeler hayvan metabolizmasında sentezlenmemekte, fakat bitkilerin sekonder metaboliti olarak üretilmektedir. Bu maddeler, radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili antioksidanlardır.

Radikal temizleme ve zincir reaksiyonları durdurma özelliğine sahip sentetik olarak dizayn edilen antioksidanlar, günümüzde ilgi çekmektedir. Troloks[®], BHA ve BHT bunlardandır.

Sentetik antioksidanlar 20. yüzyılın başlarından beri kullanılmaktaysa da yüksek dozlarının

toksik olduğu ve kansere yol açabileceğini gösteren çalışmalar sonucunda bu tip antioksidanların kullanımına sınırlamalar getirilmiştir. Bu durum doğal antioksidanlara verilen önemi arttırmıştır.

Bitkilerin sekonder metabolizma ürünleri (fitokimyasallar) olarak sentezlenen moleküller mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu özellikler taşırlar.

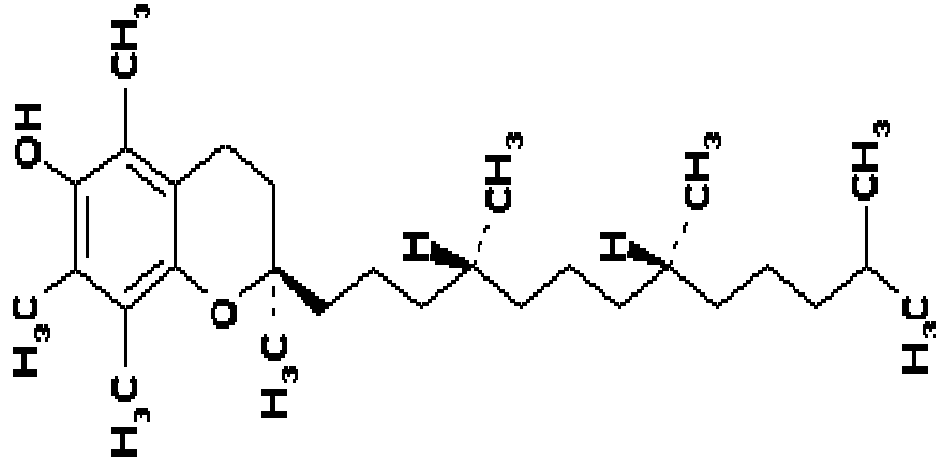
3.1.3 E vitamini (α -tokoferol)

α -Tokoferol, biyolojik olarak E vitamininin en aktif formudur. E vitamini, kimyasal yapı itibari ile tokollerden biri olup, antisterilite vitamin olarak da bilinir. E vitamini yağda çözünen önemli bir antioksidandır. Özellikle hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli antioksidan işlevler görmektedir.

Oksijen radikallerini, lipid peroksidlerini, nitrikoksidleri nötralize eden, zincir kırıcı en güçlü antioksidandır. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla sonlandırılabilir. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. GSH-Px ile serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini de peroksidlerin yapımını engeller.

Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarla, E vitamini kardiyovasküler hastalıkların, bazı kanserlerin ve kronik hastalıkların oluşum riskini azalttığı belirlenmiştir. Tokollerin (tokoferol ve tokotrienol) farklı bileşikleri E vitamini aktivitesi göstermekte, fakat en aktif formu α -tokoferol oluşturmaktadır. Geçmişte asıl olarak α -tokoferol üzerinde yoğunlaşmışken, bugün öteki tokoferoller ve tokotrienoller de ilgi çekmektedir. Araştırmalar α -tokoferolden farklı antioksidan fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir.



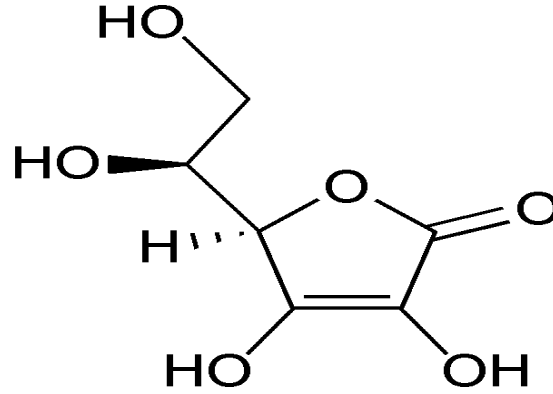
Şekil 3.3 α -Tokoferol (Vitamin E)

3.1.4 C Vitamini (askorbik asit)

C vitamini suda çözünen ve diyetle alınan önemli bir antioksidandır. Serbest radikallerin, makromoleküllerde (lipid, DNA), kardiyovasküler hastalıklar, felç, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve katarakt dahil kronik hastalıklarda oluşturduğu oksidatif hasarların olumsuz etkisini azaltır (Singh vd. 2006).

Reaktif oksijen ürünleriyle ($O_2\cdot$, $OH\cdot$ ve singlet oksijen) kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Suda çözünen bir vitamin olmasına karşın lipid peroksidasyonuna sebep olan radikalleri de temizleyerek lipid ve zarları oksidan hasara karşı korur. E vitamini gibi zincir kırıcı özelliğe sahiptir.

İndirgeyici gücü yüksek olmasından dolayı organizma için önemi büyüktür. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Fe^{+3} i Fe^{+2} e indirgeyen $O_2\cdot$ dışındaki en güçlü hücre içi moleküldür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir.

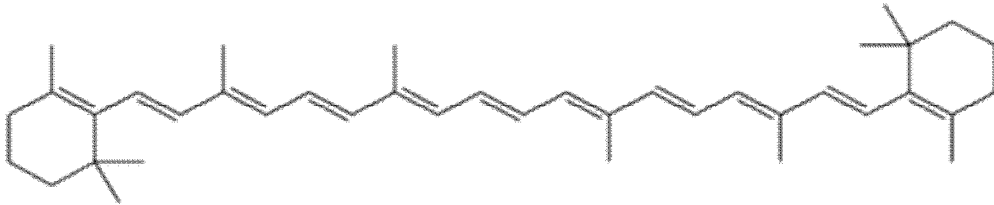


Şekil 3.4 Askorbik asit (vitamin C)

Bitkiler, mikroorganizmalar ve bazı hayvan türleri kendi askorbik asitlerini glukozdan üretmektedir. Ancak insanlar, yarasalar, domuz ve insan benzeri primatlar C vitamininin üretimi için gerekli enzim sistemine sahip olmadığından dolayı, bunu kendileri üretememekte ve dışarıdan besinlerle almak zorundadırlar.

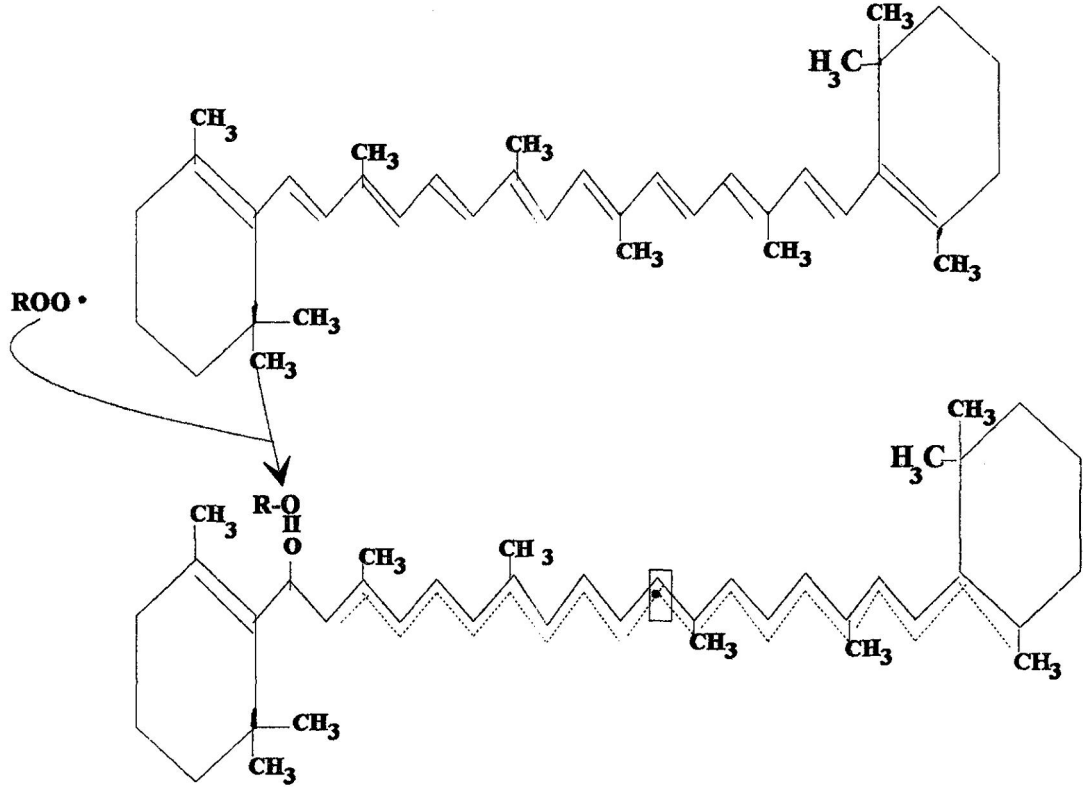
3.1.5 β - Karoten

Karoten, fotosentez için önemli fotosentetik bir pigmenttir. Soğurduğu ışığı klorofile aktararak fotosenteze katkıda bulunur. Karotenler terpen yapıda olup, sekiz izopren birimden biyokimyasal olarak sentezlenirler. $C_{40}H_{56}$ formüllü, başlıca iki izomeri vardır; α -karoten ve β -karoten. β -karoten iki retinil gruptan oluşur ve ince bağırsak mukozasında β -karoten dioksijenaz tarafından yıkıma uğrayıp, yağda çözünen A vitaminine (retinol) dönüştürülür. β -karoten karaciğerde depolanıp gerekli olduğu zaman A vitaminine dönüştürülebildiğinden dolayı bir provitamin sayılmaktadır.



Şekil 3.5.1 β -karotenin yapısı

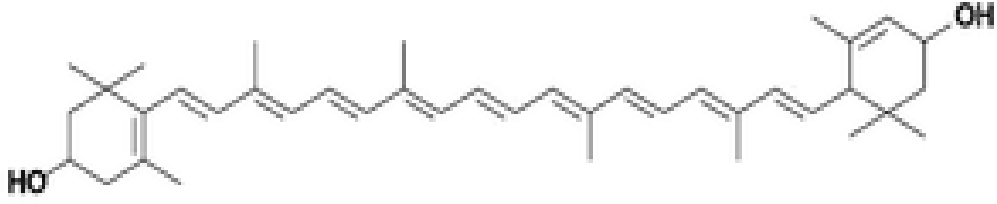
β -karoten biyolojik sistemlerde yağlarda çözüldüğünden dolayı özellikle lipid peroksidasyonunu önleyen ve serbest radikallerin temizlenmesiyle hücre zarını koruyan önemli bir antioksidandır. Ayrıca peroksil radikallerini giderme kapasitesi olarak düşünüldüğünde β -karoten en yüksek aktiviteye sahip antioksidanlardır, bunu sırasıyla α -tokoferol ve askorbik asit izlemektedir (Singh vd. 2006).



Şekil 3.5.2 β -karotenin bir peroksi radikali ile reaksiyonlaşması (Devlin, 1992)

3.1.6 Lutein

Lutein, yapı olarak β -karotene çok benzeyen bir karotenoiddir. Bitkilerde bulunan sarı renkli organik bir bileşiktir. Gıdalara renk vermek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılır. Canlılar tarafından sarı renkli besinlerle tüketilir ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Genellikle yağ asitleri ile kovalent bağ halinde bulunur.



Şekil 3.6 Luteinin yapısı

Lutein göz retinasında görmeden sorumlu merkezi, göz merceği ve makula (sarı benek) adı verilen bölgesinde yüksek oranlarda bulunur. Hipoteze göre lutein bu bölgeyi yüksek enerjili ışığın oksitleyici etkisinden korur. Ayrıca sarı benekte lutein fazlalığı, yaşlılıkta sarı benek tahribatıyla olan görme problemi riskini azaltıcı etkisi vardır. Deneysel çalışmalarda diyetle zengin Lutein alımının makula dejenerasyonu ve katarakt gibi ciddi göz hastalıkları riskini azalttığı anlaşılmıştır. Bunların yanında singlet oksijenin oluşturduğu serbest radikalleri inhibe ederek kanser, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve makula dejenerasyonu gibi hasarları azaltmaktadır. (Singh vd. 2006)

3.1.7 Fenolik Bileşikler

Bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolizma ürünleri olup, özellikle meyve ve sebzelerdeki renk, tat ve kokudan sorumlu fitokimyasallardır. Bunlar serbest radikallere karşı koruyucu, mikroorganizmalara karşı insektisit ve herbisit olarak rol oynarlar. Başlıca fitokimyasallar; fenolikleri, flavonoidleri ve karotenoidlerdir.

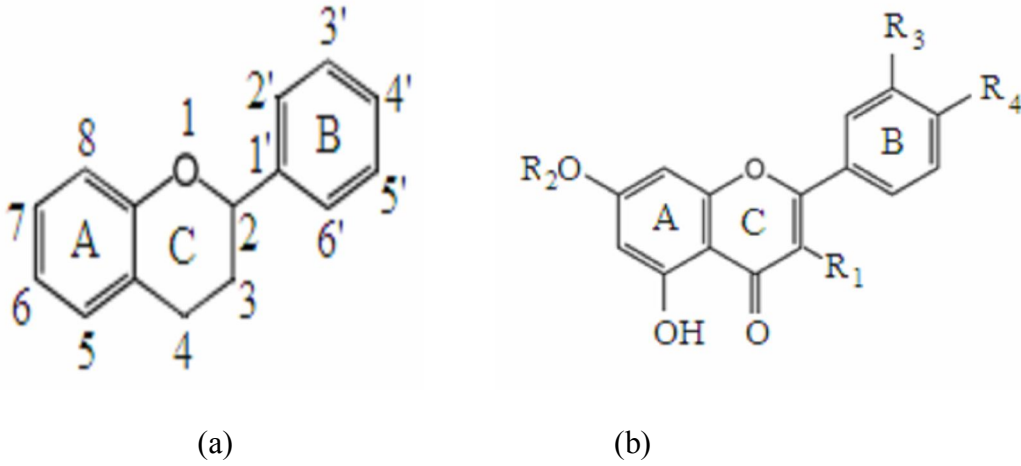
Fenolik bileşikler altı üyeli aromatik halkaya direkt bağlı bir hidroksil grubu (-OH) içeren ve bu hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli, zayıf asidik, aromatik bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin, indirgeyici ajan, hidrojen verici, singlet oksijen giderici ve metal kelatlayıcı gibi redoks özelliklerinden dolayı yüksek antioksidan aktivitesi bulunmaktadır. Böylece antioksidan olarak, insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metalleri şelatlama ve otooksidasyonu önleme konusunda fenolik bileşikler oldukça etkilidirler (Ekinci 2008).

Bitkiler aleminde 6000'den fazla fenolik bileşiğin veya polifenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılabilir.

Bunlar çok önemli antioksidanlar olup, bitkisel gıdaların tüketilmesiyle, sağlığa pozitif yönde etki etmektedir.

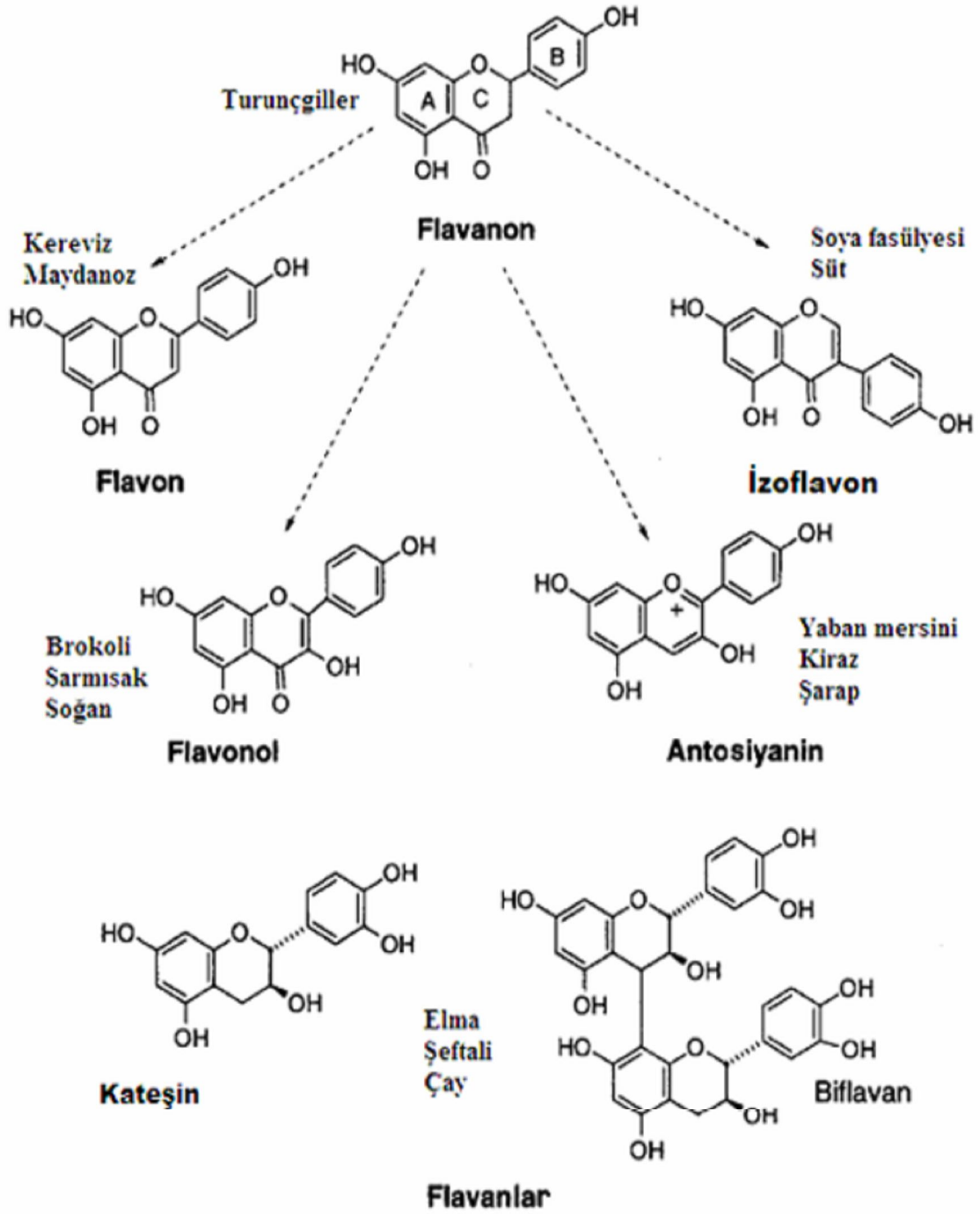
Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptirler. Başlıca fenolik asitler gallik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ve ferulik asit, kafeik asit, kumarik asit gibi hidroksi sinnamik asitleri içerirler.

Flavonoidler ise, özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerin (renk maddelerinin) C₆-C₃-C₆ çatısına sahip olanlarına verilen addır. Flavonoidlerin tümü C₆-C₃-C₆ yapısındadır, ancak moleküldeki hidroksil (OH) grubu sayısı ve dağılımı açısından farklıdırlar. A halkası üç karbonlu bir bileşik olan malonil-CoA (sinamik asit)'dan sentezlenirken, C ve B halkaları şikimat ve fenilpranoid metabolik yolu üzerinden yine glukozdan sentezlenir. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanmasıyla, bir başka deyişle, içerdikleri C halkasındaki değişimlere göre altı ana alt gruba ayrılabilirler: flavanonlar, flavonlar, flavonoller, antosiyanidinler, flavanlar, izoflavonoidler.



Şekil 3.7.1 Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b)

Geleneksel tıpta, son yirmi beş yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış ve gerçekleştirilen çalışmalar sonucu flavonoidlerin yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında yakın bir ilişki olduğu bulunmuştur. Flavonoid yapısında C-4' pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması antioksidan aktiviteyi artırırken, serbest 4'-OH grubunun metoksil grubu ile substitue olması aktiviteyi önemli derecede azaltığı anlaşılmıştır.



Şekil 3.7.2 Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Genel olarak, flavanonlar turunçgil meyvelerde, flavonlar baharatlarda, izoflavonoidler baklagillerde, antosiyanin ve kateşinler meyvelerde, flavonoller tüm meyve ve sebzelerde bulunurlar.

Flavonoller ve glikozitleri çoğunlukla meyvelerin dış kısmında bulunur. En çok bilinen flavonoller kuersetin ve kaempferoldür. Diyetimizdeki en önemli flavonoiddir ve özellikle soğan ve çayda bolca bulunur. Kuersetin, luteolin ve galangin yapılarındaki farklılığa rağmen kuvvetli antioksidan olarak bilinirler. Kuersetin ve rutin lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek, hücreyi okside LDL'den gelen zarara karşı korur. Kan damarlarının hücre aralarını yapıştırarak kanın damarın dışına sızmasını önler.

İzoflavonoidler, östrojenik aktivitesi iyi bilinen farklı bir flavonoid sınıfıdır ve çoğunlukla baklagillerde bulunur. 'B' halkası oryantasyonu yapısal olarak genel flavonoidlerden ayrılır. LDL oksidasyonunu azaltmada etkin oldukları bulunmuştur.

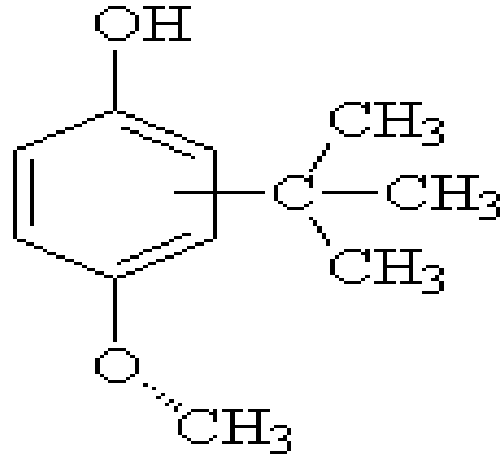
Antosiyaninler, taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde, kiraz ve erikte, patlıcan, kırmızı lahana ve turpta kırmızı ve mavi rengi üretir. Antosiyanin rengi pH'a bağlıdır. Antosiyanin genellikle, pH 3,5' te kırmızıdır, pH artışıyla önce renksizleşir ve sonra maviye döner. Antosiyaninler, yenilebilir tahıllarda, köklerde ve yeşil sebzelerde bulunmasına rağmen özellikle meyvelerle ilişkilidir. İçecekler ve diğer besin maddeleri için renklendirici ajan olarak kullanılırlar. Bir de farmasötik ürünlerin boyanmasında kullanılırlar. Test edilen antosiyaninlerin çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Genel olarak 'Flavonoidler' ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, enzim aktivitelerini düzenleme, hücre çoğalmasını inhibe etme, demir ve bakır şelasyonu, α -tokoferol rejenerasyonu fonsiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, antibiyotik, immünstimülan, antiallerjik, antidiyareik, antiülser, östrojenik, antiviral ve daha birçok etkilerinin olduğu söylenebilir (Ekinci 2008).

3.1.8 BHA (Bütillendirilmiş Hidroksianisol)

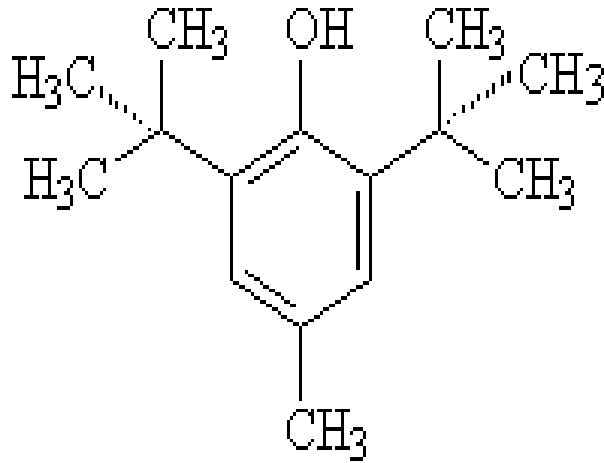
Gıda sektöründe koruyucu olarak kullanılmaktadır. Lipid oksidasyonunu engeller.

Doğal olarak biberiye (*Rosmarinus officinalis*) bitkisinde bulunmuş sentetiği oluşturulmaya başlanmıştır.



Şekil 3.8 Bütilendirilmiş Hidroksianisol (BHA)'un yapısı

3.1.9 BHT (Bütilendirilmiş Hidroksitoluen)



Şekil 3.9 Bütilendirilmiş Hidroksitoluen (BHT)'nin yapısı

Suni olarak laboratuvarlarda üretilmekte ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Yüksek dozlarda kullanılması tümörlerin gelişimini hızlandırır ve organizmaya toksik etkileri vardır.

Sentetik antioksidanların gıdalardaki kullanımı 1940'lı yıllarda BHA ve gallik asit esterlerinin oksidasyonu önlediklerinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Demir ve bakır gibi titrasyon metallerinin zararlı etkileri sitrik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve türevlerinin metal deaktivatör veya şelat ajanı olarak etki ettikleri bulunmuştur. Böylece 1954'te ABD'de BHT'nin gıdalarda kullanılmasına müsaade edilmiştir. Tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) ise 1972'de ticari ölçüde kullanılmaya başlamıştır (Erkan vd.2008)

Oksidasyonu önlemek veya ortadan kaldırmak amacıyla en çok Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), propilgallat (PG) ve Tersiyer bütül hidroksi kinon (TBHQ) kullanılmaktadır (Nenadis vd. 2003, Erkan vd. 2008).

Gıdalara antioksidanların katılması, gıdaların lezzetini, rengini korumak ve vitaminlerin yıkımını engellemek için gereklidir.

Nenadis vd. (2003), BHA, BHT, TBHQ, α - tokoferol, trolox ve kafeik asit gibi bazı antioksidanları fosfatidilkolin lipozomları ve yağ/su emülsiyonlarında karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Sonuçlar, BHA ve BHT'nin çok az eklendiklerinde bile en yüksek etkiye sahip olduğunu; α - tokoferolün orta aktiviteye sahip olduğunu; CA'nın pro-/antioksidan davranışının konsantrasyona bağlı olduğunu; TBHQ'nun aktivitesinin CA'dan biraz daha iyi ve Troloxla karşılaştırılabilecek düzeyde olduğunu göstermiştir.

Raporların BHT ve BHA'nın yüksek dozlarda toksik ve kanserojen etkilerinin olduğunu göstermesiyle, bu maddelerin kullanımına sınırlamalar getirilmiş veya birçok ülkede yasaklanmıştır (Japonya'da BHA'nın, Kanada, Japonya ve Avrupa'da TBHQ'nun kullanımı yasaklanmıştır). Tüketicilerin gıda katkı maddelerinin güvenilirliği hakkında bilinçliliğinin artması nedeniyle; düşük etkisi ve yüksek maliyeti olmasına rağmen tokoferol gibi alternatif, doğal ve güvenilir antioksidanların tanımlanması gerekmiştir.

3.2 Antioksidanların sağlık için önemi

Günümüzde yaklaşık 20 milyon kişi kanser hastası ve her yıl 7 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir.

Tıbbi istatistiki çalışmalar, sağlıklı beslenmeye dikkat edilmesi, yüksek dozda antioksidan alınması ve düzenli egzersizin; yaşam kalitesini yükselttiği ve birçok hastalıkla mücadelede olumlu etkileri olduğunu göstermiştir.

Son yıllarda alternatif tıbbın kanser tedavisinde kullanılması ve bazı kanser türlerinde olumlu etkilerinin tespit edilmesi bu alanda yeni çalışmaların yapılmasını teşvik etmiştir. Kanser hastalarının başvurduğu tamamlayıcı, alternatif tıp, yaygın olarak kullanılmakta bu konularla ilgili çeşitli yayınlar bulunmaktadır. Örneğin meme kanseri günümüzde birçok ülkede kadınlarda görülen en yaygın kanser türlerinden biri olup, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda görülen önemli ölüm nedenlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda ısırgan otunun tüketilmesinin meme kanseri ve hormonal bir kanser olan prostat kanserinin gelişimini engellediği tespit edilmiştir (Tello vd. 2008).

Epidemiyolojik verilerin yanı sıra in vitro çalışmalar, meyve ve sebze tüketimiyle antioksidan fitokimyasalların alınmasının kanser tipleri ve diyabet de dahil olmak üzere, Alzheimer hastalığı ve kardiovasküler hastalıklar gibi ömenli dejeneratif birçok hastalığa karşı savunma sistemini güçlendirdiği ve koruma sağladığı anlaşılmıştır (Singh vd. 2006, Abdille vd. 2005). Antioksidan özellik gösteren askorbik asit, α -tokoferol ve β -karoten gibi vitaminler, meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerini oluşturmaktadır. Ancak meyve ve sebzelerin hastalıklara karşı olumlu etkileri, sadece vitaminlerle sağlandığı düşünülmemektedir. Daha az bilinen farklı fitokimyasal bileşikler yüksek antioksidan aktivite gösterebilir ve asıl koruyucu etkiyi sağlayabilirler. (Abdille vd. 2005) Yapılan birçok çalışmayla bitklerdeki antioksidan etkinin, vitaminlerin dışında flavonoidler, isoflavonlar, antosiyanin, kateşin, isokateşin ve benzer fenolik bileşiklerin oluşturduğu anlaşılmıştır. Araştırmalar indol-3-karbinol (I3C), sulforaphane ve diğer indollerin vücuttaki antioksidanları stabilize ve aktive ederek detoksifikasyon mekanizmalarını harekete geçirdiği, bu sayede kanser yapan maddelerin de kısmen ortadan kaldırıldığı anlaşılmıştır. (Singh vd. 2006)

Araştırma sonuçlarında; Meyve, sebze, tam tahıllar, doymamış yağlar, bazı mikro elementler

ve fiziksel aktivite ile kanser riski arasında negatif ilişki olduğu, doymuş yağlar, obezite, beden kitle indeksi, gıda hazırlama yöntemleri (tuzlama, tütüleme, kürlleme, turşu, yüksek sıcaklıklarda pişirme vb.) ile kanser arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir.

Antioksidanlar bakımından zengin gıdalar, kalp hastalıkları, çeşitli kanser tipleri, Parkinson, Alzheimer ve iltihaplı hastalıkların yanı sıra yaşlanma ile oluşan tüm hücrel sorunların da önlenmesinde etkin rol oynamaktadır.

Araştırmacılar, β -karoten ve C vitamininin, HIV virüsü olan hastalarda, klinik belirtilerin başlamasını geciktirdiğini, antosiyaninlerin de kalbi besleyen koroner damarların tıkanmasını ve kalp krizi riskini azalttığı belirlenmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar β -karotene zengin meyve ve sebze tüketiminin akciğer kanseri riskini azalttığını, özellikle turpgiller (*Brassica*) ve domates tüketiminin güçlü etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak β -karoten desteklerinin özellikle sigara içen ve yüksek akciğer kanseri riski taşıyan gruplarda bu riski artırdığını göstermiştir.

Yeşil renkli sebzeler ve havuç tüketimiyle meme kanseri arasındaki negatif ilişkili olduğu,

E vitamini, turpgiller, sarı renkli sebzeler ile domates tüketiminin prostat ve kolorektal kanseri üzerine olumlu etkileri olduğu bulunmuştur.

C vitamini içeren meyve ve sebzelerin mide, ağız, farinks, özafagus, akciğer ve pankreas kanser risklerini azalttığını göstermiştir.

4. ÇİRİŞ OTU (*Asphodelus aestivus* Brot.)

Asphodelus aestivus Brot. (Çiriş otu), Liliaceae familyasından, 50-150 cm boyunda, yaprakları kılıç şeklinde, nisan-mayıs aylarında çiçeklenen (Beyaz, çiçek yapraklarının orta kısmında pembe veya kahverengi damarlanmalar bulunan, 6 petallı), 7mm büyüklüğünde bezelye şeklinde yeşil meyvelere (6 tohumlu) sahip ; Afrika, Arap ülkeleri, Mısır, Türkiye ve Avrupa'nın Akdeniz iklimi görülen kesimlerinde yayılış gösteren çok yıllık bir bitkidir. Özellikle yangın sonrasında kuru, besince fakir, kumlu topraklarda, yol kenarlarında, bol kireçli topraklarda, otlak ve meralarda deniz seviyesinden 600 m yüksekliğe kadar kendiliğinden yetişir.

Akdeniz ekosisteminde yayılış gösteren bitki için, Homeros destanında şöyle söyler; "Ölmüşlerin ruhları, ilk olarak sadece aspodellerin (*Asphodelos leimon*) çiçeklendiği, yer altı çayırlarına geldiler." (Odyssey, XI, 539, 573, XXIV, 13), (Sawidis vd. 2005)

Çiriş otu ekonomik olarak önemlidir, bitkinin içerdiği yüksek miktardaki nişasta, inulin, yağ asitleri ve şekerden dolayı besin olarak insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilmekte (Pirdal 1986) , hemoroid, saçkıran, mafsals ağrılarının tedavisinde, yanıklarda ve yaralanmalarda tedavi edici olarak, maya endüstrisinde mayalandırmaya yardımcı olarak, ciltçilik ve ayakkabıcılıkta yapıştırıcı olarak, Erzurum bölgesinde ise ehram kumaşına sertlik ve parlaklık vermek için kullanılmaktadır (Baytop 1999). İtalya'da 'Rignano' peynirinin üretiminde yapraklarından, biyogaz ve biyoetanol üretimi için kök yumrularından yararlanılmaktadır (Polycarpou 2009).

Asphodelus aestivus geleneksel tedavi yöntemlerinde, Gönen yöresinde hıdrellez kamçısı olarak bilinir ve yumru kökleri hemoroid tedavisinde kullanılır (Gürhan ve Ezer 2004). Ayrıca kökleri birçok yörede yanık ve yara tedavisinde kullanılmaktadır. Kökler veya bitkinin totalinin ezilmesiyle elde edilen sıvı, kesik ve yaralarda uygulanmaktadır. İran'da oldukça yaygın olarak diş ağrısı, öksürük, mide ve koleretik ağrılarda, idrar söktürücü ve müşhil olarak kullanılmaktadır. Bitkinin kök kısımları İsrail'de egzamalarda, sedef ve mantar hastalıklarında, çatlamış derinin tedavisinde tonik olarak kullanılmaktadır. (Handa vd.)

Bazı ülkelerde, kök yumruları kurutulup suda haşlanarak müsilaj elde edilmekte veya çeşitli tahıl ve patatesle karıştırılarak aspodel ekmeği üretilmektedir. İran'da küçük parçalara

bölünen kurutulmuş kök yumrularından su ve alkolle karıştırılarak güçlü bir yapıştırıcı elde edilmektedir. Ayrıca doğu ülkelerinde *Asphodelus bulbosus*'den yumrularından toz salep üretilmektedir. (Sawidis vd . 2005)

A. aestivus'un kökleri de dahil olmak üzere birçok dokusunda kalsiyum oksalat, rafid kristalleri ve çeşitli alkaloid bileşikler bulunmaktadır. Salgılanan nektarın yanında bu yapıların da otoburlara karşı savunma amaçlı olduğu düşünülmektedir. (Weryszko-chemielewska vd. 2006)

Bitkinin yetiştiği bölgenin toprak ve iklim özelliklerinin yanı sıra kirlilik, kuraklık gibi fiziksel etmenler, bitki gelişimini kimi zaman pozitif kimi zaman negatif yönde etkiler. Kimyasal maddeler ve jeotermal sıvı buharları atmosferi kirletmekte ve bitki gelişimini negatif yönde etkilemektedir. (Örneğin; bor (B), civa (Hg), arsenik (As), kurşun (Pb), amonyak (NH₃), lityum (Li), karbon dioksit (CO₂), hidrojen sülfür (H₂S) ve çeşitli tuzlar.) Ancak *A. aestivus*'un bu tür kirletilmiş bölgelerde rahatlıkla geliştiği görülmüştür. Yapılan araştırmalar bu bölgelerde yetişen bitkinin yapısında B, Ba, Ca, Cr, Fe, K, Mg, Na, Pb gibi toksik elementlerin topraktan daha yoğun biçimde bulunduğu anlaşılmıştır. Bu da bitkinin çevre kirliliği ve toprak ıslahında etkili olduğunu ve kirleticilerini ortamdan uzaklaştırdığını göstermektedir. (Yağan vd. 2008)

A. aestivus yıl içerisinde iki periyot geçirir. Birincisi aktif formu sonbahar- geç ilkbahar döneminde yapraklanma ve fotosentetik dönem, ikincisi inaktif formu, çiçeklenme ve tohum ürettikten sonra yaz aylarında dinlenme dönemidir. Kışın sonlarında (şubat-mart) kök yumrularından uzun düz yapraklar (40–90 cm uzunlukta ve 2–4 cm genişlikte), nisan- mayıs aylarında 60-200 çiçek taşıyan çiçek sapları (70–170 cm uzunlukta) gelişmektedir. Çiçekler beyaz pembe veya kahverengi damarlıdır. Haziran ayında meyveler oluşmaktadır. Yaprakların içerdiği steroid ve glikozidler yaprakları otoburlara karşı korumaktadır. (Sawidis vd. 2005)

A. aestivus çiçeklerindeki polen ve nektar, bal üretiminde oldukça önemli bir yer almaktadır. Çiçeklerinde nektar üreten dokular 3 bölümlü olup, yumurtalıkların orta ve alt kısmına doğru, ortası boş lümen şeklinde dairesel biçimde 3 hücre sırasından oluşmaktadır. Nektarın çıkışını sağlayan yumurtalıkların üzerinde 2/3 yükseklikte uzun açıklıklar bulunduğu görülmüştür. Genç çiçeklerde sekresyon başlayana kadar açıklıklar çok küçük ve sekresyonla beraber açıklıklar büyümektedir. Burada salgılanan nektar dış epidermisin hücre duvarında yapışkan

bir tabaka oluşturmaktadır. Bu tabaka kuş ve böcekleri çekmekte ve tozlaşmaya yardımcı olmaktadır. (Weryszko-chemielewska vd. 2006)

A. aestivus'un tohumlarının kaplı olduğu manto ve müsilaj onların normal şartlar altında çimlenmelerine imkan vermemektedir. Çimlenmeleri için öncelikle bu kabuktan ayrılmaları gerekmektedir. Kabuklarından ayrılan tohumlar, 15°C'de 6/18 saatlik gün ışığı periyodunda maksimum çimlenme göstermektedir. Tohumlar ışığa duyarlı ve toprak yüzeyinden 1cm derinlikteyken en iyi çimlenme göstermektedirler. Ayrıca topraktaki tuz konsantrasyonuna da duyarlıdır, tuz konsantrasyonu arttıkça tohumların osmotik basıncı da artmakta halbuki osmotik basıncın artışıyla çimlenme azalmaktadır. (Pirdal ve Öztürk 1986)

A. aestivus'un kök yumruları güçlü etli depo dokudan oluşur. Tuberleri, hızlı su alabilen fakat su kaybını azaltan, mekanik ve ozmotik koruma sağlayan, güçlü kalınlaşmış (4-6 hücre sıralı) epidermal zarla çevrilidir. Kortekslerindeki ince duvarlı idioblastlara sayısız kalsiyum oksalat ve rafid kristalleri içeren büyük vakuollü tonoplastlar içerirler. Morfolojik varyasyonlar rafid kristalleri arasında gözlenmektedir. İçerdikleri rafid kristalleri, parankim dokuyu otoburlara karşı korumaktadır. Damarların yanındaki vakuoller yoğun katlanmalar yapmakta ve içlerinde yoğun olarak polisakkaritler ve yağlar biriktirmektedir. *A. aestivus*'un hem kök yumruları, hem de bitkinin geri kalan kısımları, Akdeniz ikliminin sıcak ve kurak yazlarına karşı morfolojik olarak uyum sağlamıştır. Kök yumrular su ve besin depolamakta böylece iklim dalgalanmalarına karşı kendini korumaktadır. (Sawidis vd. 2005)

Literatürde *A. aestivus*'un antioksidan aktivitesiyle ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Ancak antimikrobiyal aktivitesiyle ilgili yapılan çalışmalarda, çiçek, meyve ve bitki kısımlarından elde edilen ekstraların test edilen mikroorganizmalara karşı etkili olduğu anlaşılmıştır. Bitkinin meyve ekstralarının antimikrobiyal etkisi, diğer bitki kısımlarından elde edilen ekstralarının antimikrobiyal etkisinden yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca deneyde ticari antibiyotiklerle karşılaştırmalar yapılmış, kullanılan organizmalardan bazıları bu antibiyotiklere dirençli olduğu halde, bitkinin meyve kısımlarının etil alkol ekstralarının antimikrobiyal etkisinin kayda değer olduğu görülmüştür. (Oskay vd.2007)

Bu çalışmada *A. aestivus*'un antioksidan aktivitesi incelendi, sentetik ve doğal antioksidanlarla karşılaştırma yapıldı.





Şekil 4.1 *Asphodelus aestivus*'un farklı dönemlerdeki görüntüsü.

5. MATERYAL ve METOD

5.1 Kullanılan Materyaller

5.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Standart olarak kullanılan antioksidanlar BHT, BHA, Troloks, α –tokoferol, askorbik asit ve diğer tüm kimyasal maddeler HPLC saflıkta olup, Merck, Sigma-Aldrich, Fluka, Riedel-de Haen vs. firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 Kullanılan Kimyasallar ve ürün kodları

KİMYASAL	FİRMA/NO
BHA	Fluka / 20021
BHT	Fluka / 34750
Troloks	Fluka / 56510
Asorbik asit	Sigma-Aldrich / 33034
α -Tokoferol	Fluka / 95240
Epikateşin	Fluka / 45300
Kateşin	Fluka / 22110
ABTS	Sigma / A-1888
DPPH	Sigma-Aldrich / D-9132
DMPD	Merck / 103067
Prolin	Sigma / P-5607
EDTA	Merck / 108421
B-karoten	Fluka / 22040
Linoleik asit	Sigma / L-1268
Tween 20	Merck / 167657
Tween 40	Sigma / P-1504
Potasyum Persülfat	Sigma / P-9392
Amonyum tiyosiyanat	Merck / 101213
Naftiletillen diamin dihidroklorid	Fluka / 70720
Sülfanil amid	Sigma-Aldrich / S-9251
Sodyum nitro prussiyat	Merck / 10654
NaNO ₂	Merck / 106544
NADH	Sigma / 43420
Fenazin methosülfat	Sigma / P-9625

Nitroblue tetrazolium	Sigma-Aldrich / N-6876
NaOH	Merck / 106462
TCA	Sigma-Aldrich / 33731
2-Deoksiriboz	Fluka / 31170
Sülfosalisilik asit	Merck / 800691
2-Thiobarbiturik asit	Merck / 108180
Ferrozin	Fluka / 82950
Ninhidrin	Sigma-Aldrich / N-4876
K ₃ Fe(CN ₆)	Sigma / P-8131
FeCl ₂	Fluka / 44939
FeCl ₃	Fluka / 44943
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck / 103965
AlCl ₃	Merck / 801081
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haen / 04272
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Riedel-de Haen / 04269
Tris	Sigma / T-1503
K ₂ HPO ₄	Fluka / 60356
KH ₂ PO ₄	Merck / 104871
NaCl	Fluka / 71376
KCl	Merck / 104936
MgCl ₂ .6H ₂ O	Riedel-de Haen / 31413
Sodyum asetat	Sigma / S-7545
Etanol	Merck / 100983
Metanol	Riedel-de Haen / 24229
Aseton	Riedel-de Haen / 24201
Kloroform	Merck / 102445
Toluen	Sigma / C-2432
Asetik asit	Riedel-de Haen / 27225
Fosforik asit	Merck / 100573
HCl	Merck / 100314
H ₂ O ₂	Riedel-de Haen / 18304

5.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Aktivite ve % inhibisyon tayini için:
Philips PU8740 UV/VIS spektrofotometre
- Kullanılan tampon ve çözeltilerin pH kontrolü için:
Sartorius Basic Meter PB-11 pH metre

- Santrifüj için:
Hettich Zentrifugen EBA-20 santrifüj
- İnkübasyon için:
GFL 1086 çalkalamalı su banyosu
- Çözeltiler için:
Chiltern Hotplate HS31 manyetik karıştırıcı
- Kullanılan tampon ve çözeltilerin saklanması için:
Bosch marka buzdolabı kullanılmıştır.

5.1.3 Kullanılan Materyalin Temin Edilmesi

Araştırma materyali olarak kullanılan *Asphodelus aestivus* Brot. (çiriş otu) bitkisi, Nisan 2008 tarihinde İstanbul'da semt pazarından temin edilmiş olup, saf su ile temizlenerek güneş ışınlarına maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulmuş olan materyal oda sıcaklığında, nemden uzak ve karanlık ortamda muhafaza edildi.

Kullanılan bitkinin tür tayini İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Tamer Özcan tarafından yapıldı ve Flora of Turkey and the East Aegean Islands kayıtlarıyla karşılaştırıldı (Davis vd. 1984).

5.1.4 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Kuru bitki materyali küçük parçalara bölündü ve değişik polariteye sahip çözücülerle (etanol, metanol, aseton) Soxhlet ekstraksiyon cihazında ekstrakte edildi. Su ekstresi ise infüzyon metodu ile hazırlandı.

Soxhlet ekstraksiyonu; 5 g kurutulmuş ve küçük parçalara bölünmüş olan bitki örneği 50 mL çözücü ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Daha sonra çözücü vakum altında döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldı ve bitki ekstraktları elde edildi. Bu işlem etanol, metanol ve aseton için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

Su ekstresi için 5 g bitki örneği 50 mL kaynar distile su içine atıldı ve 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, soğutuldu ve süzüldü. Daha sonra suyu uzaklaştırıldı.

Elde edilen tüm ekstraktlar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Her bir denemede, bu

ekstrelerden belli oranlardaki ekstre çözeltileri hazırlandı. Ekstrelerin kuru madde miktarı su, etanol, metanol ve aseton için sırasıyla %26,74; %35,74; %70,38 ve %21,88 olarak hesaplandı.

5.2 Antioksidan Tayin Metodları

5.2.1 Toplam flavonoid içeriğinin tayini

Total flavonoid içeriği, Zhishen vd. (1999)'nin geliştirdiği kolorimetrik metod kullanılarak tayin edildi. Hazırlanan ekstre çözeltileri (mg/mL) veya standart olarak (+)-kateşin çözeltisi, (20-100µg/mL) değişik konsantrasyonlarda seyreltilerek deney tüpü içerisine 0,25mL alınıp 1,25mL distile su ile karıştırıldı. Daha sonra 75µL %5 (m/v) sodyum nitrit çözeltisi eklendi. 6 dakika sonra, 150µL %10 (m/v) alüminyum klorür çözeltisi ilave edildi ve 0,5mL 1M sodyum hidroksit çözeltisi eklenmeden önce 5 dakika daha beklendi. Karışım distile suyla 2,5mL'ye tamamlanarak iyice karıştırıldı. Karışımın absorbansı spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda hemen ölçüldü. Sonuçlar her gram ekstre için (+)-kateşin mg ekivalenti (±SD) olarak ifade edildi.

5.2.2 Toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin tayini

Total klorofil ve total karotenoid içeriği, Kocaçalışkan ve Kadioğlu (1990)'nun geliştirdiği metoda göre ölçüldü. Bu metoda göre; 10mg bitki ekstresi 10mL distile suda çözüldü. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede 450, 645 ve 663nm dalga boylarında ölçüldü. Total klorofil ve total karotenoid içeriği şu formüllerle hesaplandı.

$$\text{Klorofil a} = 12,7A_{663} - 2,69A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 22,9A_{645} - 4,68A_{663}$$

$$\text{Total klorofil} = 20,2A_{645} + 8,02A_{663}$$

$$\text{Total karotenoid} = 4,07A_{450} - [(0,0435 \times \text{klorofil a}) + (0,367 \times \text{klorofil b})]$$

5.2.3 Antosiyanin tayini

Kurutulmuş yapraklardaki antosiyanin içeriği, Padmavati vd. (1997)'nin geliştirdiği metodun modifikasyonu ile tayin edilmiştir. Bu yöntemde küçük parçalara bölünmüş kurutulmuş yapraklar (25mg/mL) asitlendirilmiş metanol (%1 HCl/metanol) ile karıştırılarak 24 saat buzdolabında +4 °C'de karanlıkta bekletildi. 24 saatin sonunda karışım süzüldü, 15 dakika 1000 rpm'de santrifüjlendi. Antosiyanin içeriğini ölçmek için süpernatantın 530 ve 657 nm'de absorbansı ölçüldü. Absorbans değerlerinden antosiyanin konsantrasyonu ekstinksiyon katsayısı, $31,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Antosiyanin konsantrasyonu } (\mu\text{mol/g}) = [(A_{530} - 0,33 \times A_{657}) / 31,6] \times [V(\text{mL}) / m(\text{g})]$$

5.2.4 Prolin analizi

Prolin analizi Bates (1973)'in geliştirdiği yöntemin basit modifikasyonuna göre yapıldı. Prolin analizleri için her bir örnek ekstresinden 50mg alındı ve üzerine 10 ml %3'lük sülfosalisilik asit ilave edilerek homojenize edildi. Homojenat süzüldü. Elde edilen süzüntüden 1 ml alındı, üzerine 1 ml asit ninhidrin çözeltisi (Asit ninhidrin çözeltisinin hazırlanışı: 1.25 g ninhidrinle 30 ml glasiyal asetik asit ve 20 ml 6 M fosforik asidin çözülene kadar çalkalanmasıyla hazırlanmıştır.) ve 1 ml glasiyal asetik asit ilave edilerek 100°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra buz banyosunda soğutuldu. Reaksiyon karışımının üzerine 2 ml toluen eklendikten sonra iyice karıştırıldı. Oluşan renkli toluen fazı sulu fazdan ayrılarak, absorbansı 520nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Bitki ekstralarının prolin içeriği standart prolin eğrisi kullanılarak hesaplandı.

5.2.5 İndirgeme Gücü

İndirgeme gücü Oyaizu (1986) metoduna göre yapıldı. Metodun prensibi, antioksidan bileşiklerin $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, TCA ve FeCl_3 ile oluşturduğu renkli komplekslerin 700 nm'de ölçümüne dayanmaktadır. Reaksiyon karışımının absorbansındaki artış numunenin indirgeme gücü ile doğru orantılıdır.

Deneyin yapılışında ekstre ve standart çözeltilerinden (mg/ml) değişik konsantrasyonlarda alınarak 1'er ml numune tüplere konuldu. Üzerine 2,5 ml fosfat tamponu (0,2M pH6,6), 2,5 ml potasyum ferrisiyanür (%1) ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı ve 50 °C'de 30 dakika

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir deney tüpüne 2,5ml % 10'luk TCA çözeltisinden ilave edilerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Supernatant kısmından 2,5ml alınarak deney tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 2,5ml distile su ve 0,5 ml FeCl₃ (% 0,1) çözeltisinden ilave edildi. Oluşan rengin absorbanı spektrofotometrede 700nm'de ölçüldü.

5.2.6 DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup, 517nm'de maksimum absorbanı oluşturmaktadır (Brand-Williams vd. 1995). Antioksidanlarla muamele edildiğinde, DPPH'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbanın düşüşüne sebep olmaktadır. Bu durumda solma derecesi örnek antioksidanlar için süpürücü potansiyeli göstermektedir. Sistein, glutatyon, askorbik asit, tokoferol, polihidroksi aromatik bileşikler (hidrokinon, pirogallol vs.) ve aromatik aminler (p-fenilen diamin, p-aminofenol vs.) gibi antioksidanlar hidrojen verebilmesinden dolayı DPPH radikalinin etkisini azaltarak rengini soldurmaktadır. Antioksidanların serbest radikal zincir oksidasyon reaksiyonlarını durdurucu etkisi, fenollerdeki hidroksil gruplarından hidrojeni alarak lipid peroksidasyonunun yayılmasını önlediği ve stabil sonlanma ürünlerini oluşturduğuna dayanmaktadır (Jayaprakasha vd. 2007).

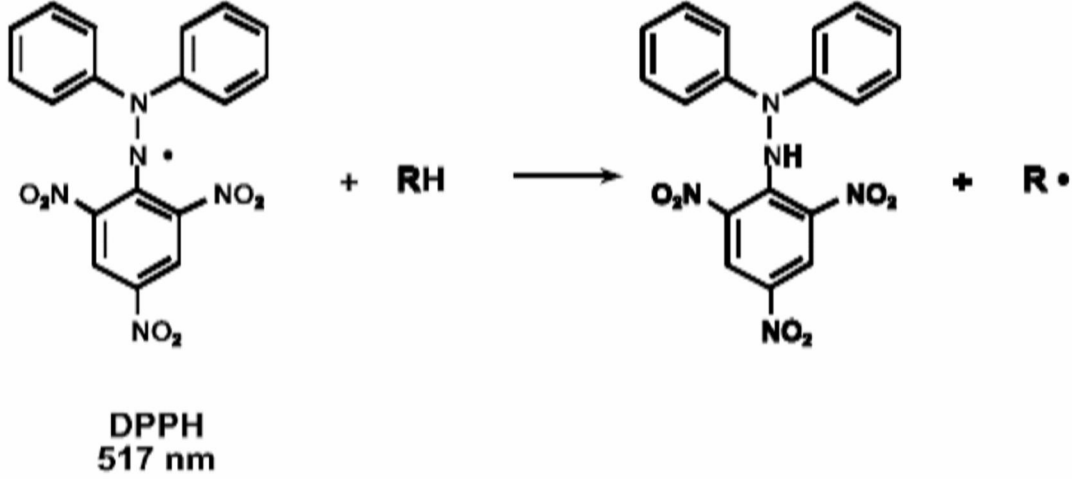
Bu yöntemin önemli bir dezavantajı, büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmekte, antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir. Bu yöntem, radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.

Yöntemde radikalın 100mM'lık metanolik çözeltisi, hazırlanan tüm ekstraların mg/ml çözeltileri için kullanıldı. Denemede Brand-Williams vd.'nin (1995) yöntemi uygulandı. Hazırlanan örnek ve standart (BHA, BHT, tokoferol ve askorbik asit) çözeltileri (mg/ml) değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. 1,5ml DPPH' çözeltisi, 0,75ml numune/standart çözeltileri üzerine eklenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında karanlıkta 15-30-60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda DPPH'in maksimum absorbanı verdiği 517nm'de absorbanlar okundu. Hesaplamalarda aşağıdaki formülle %DPPH radikal toplama etkisi (%İnhibisyon) bulundu.

$$\% \text{ DPPH' süpürme etkisi} = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$$

A_0 : kontrol reaksiyonunun absorpsiyonu

A_1 : numune veya standardın absorpsiyonu



Şekil 5.1 Koyu menekşe renkli olan DPPH radikalinin antioksidan madde ile redüklenen ve rengin açılma mekanizması

5.2.7 Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelat aktivitesi tayini Decker ve Welch, (1990) metoduna göre yapıldı. Metal şelat aktivitesi tayininin prensibi, ferrozin- Fe^{2+} kompleks oluşumunun inhibisyonuna dayanmaktadır.

Bu denemede de aynı şekilde çözülmüş olan ekstrelerden (mg/ml) belli konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Seyreltme yapılmış numunelerden 1'er ml alınarak deney tüplerine konuldu, üzerine 3,7ml distile su, 0,1ml FeCl_2 (2mM/L) eklenerek karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 0,2ml Ferrozin (5mM/L) ilave edilerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Oluşan renk 562 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Bu denemede 0,1mM EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) standart olarak kullanıldı. Her bir numune ve standart (EDTA)'dan üçer seri çalışıldı ve ortalamaları alınarak Ferrozin- Fe^{2+} kompleks oluşumunun inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Şelatlama aktivitesi} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100$$

A₀: kontrol reaksiyonunun absorbanası

A₁: numune veya standardın absorbanası

5.2.8 Toplam antioksidan aktivite tayini metodu

Antioksidan aktivite tiyosiyanat metodunun basit modifikasyonlarına göre belirlendi (Osawa ve Namiki 1981). Her bir ekstreden ve standart antioksidanlardan mg/ml olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. İstenen konsantrasyonlara karşılık gelen hacimde numune/standart çözeltilisine, toplam hacim 2,5mL olacak şekilde potasyum fosfat tampon çözeltisi (0,04M, pH 7,0) ilave edilerek seyreltildi. Üzerine 2,5mL linoleik asit emülsiyonu ilave ederek karanlıkta 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Linoleik asit emülsiyonu, Tween-20 (175µg) ve linoleik asitin (155µL) potasyum fosfat tamponu (0,04M, pH 7,0) ile 50mL'ye tamamlanmasından oluşmaktadır. 2,5mL linoleik asit emülsiyonu ve 2,5mL potasyum fosfat tamponu (0,04M, pH 7,0)'ndan oluşan ve herhangi bir ekstre veya standart içermeyen kontrol denemeleri de inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen örneklerden 24 saat aralıklarla 0,1mL örnek alındı. Üzerine 4,7mL %75 etanol ve 0,1mL %30 amonyum tiyosiyanat çözeltisi ve %3,5 HCl ile hazırlanmış 0,1mL 0,02M FeCl₂ çözeltisi eklendi. 3 dakika bekletildikten sonra oluşan rengin absorbanası 500nm'de spektrofotometrede ölçüldü

Lipit peroksidasyonunun % inhibisyonu formülle hesaplandı.

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

A₀: kontrol reaksiyonunun absorbanası

A₁: numune veya standardın absorbanası

5.2.9 ABTS^{•+} radikal süpürme aktivitesi

ABTS radikal temizleme yöntemi, Arnao vd. (2001)'nin geliştirdiği yöntemine göre uygulandı. Bu yöntem, ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotazolin-6-sulfonik asit)'in oksidasyonu ile oluşturulan ABTS^{•+} radikal katyonunun üzerine, antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu radikalın indirgenmesi ve renk kaybının oluşması temeline dayanmaktadır. Mavi/yeşil renkli olarak oluşan ABTS^{•+} radikali, 600-750nm dalga boyunda kuvvetli absorpsiyon vermekte ve spektrofotometrede kolaylıkla belirlenebilmektedir.

ABTS^{•+} radikali, antioksidan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde radikal, ABTS'nin renksiz formuna çevrilmiştir.

Bu denemede 7,4mM ABTS çözeltisi ve 2,6mM potasyum persülfat çözeltisi kullanılmaktadır. Her iki çözelti eşit miktarda karıştırılarak, 12 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Meydana gelen ABTS^{•+} radikal çözeltisinden 1mL alındı, üzerine yaklaşık 60mL metanol çözeltisi ilave edilerek spektrofotometrede 734nm dalga boyunda absorbansı $1,1 \pm 0,02$ olacak şekilde seyreltildi. Farklı konsantrasyonlardaki örnek çözeltilerden 150µL alınarak, üzerine ABTS^{•+} radikal çözeltisinden 2850µL ilave edildi ve 2saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda spektrofotometrede 734nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Sonuçlar standart olarak kullanılan trolox ile karşılaştırıldı.

Ticari olarak üretilmiş, ABTS radikalinin çalışma prensibine dayanan ve total antioksidan kapasite düzeyini otomatik analiz eden Randox-TAS kitleri (Randox, Ireland) de bu amaçla üretilmektedir.

5.2.10 Nitrik oksit radikal süpürme aktivitesi

Nitrik oksit, paramanyetik renksiz bir gazdır. Anti π molekül orbitalinde taşıdığı eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle radikal özelliği taşır. Oldukça reaktif bir moleküldür ve yarılanma ömrü 6-10 sn olarak hesaplanmıştır. NO yüksüz bir molekül olduğu için, sıvı ortamlara serbestçe difüze olabilir ve hücre membranlarından rahatça geçebilir. Su, ultrafiltrat, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda NO, stabilitesi saatler sürebilen nitrite okside olur. Kanda nitrit (NO_2^-) hızlı bir şekilde nitrate (NO_3^-) dönüşür. Ayrıca değişik hastalıklarda kan ve diğer materyallerde, nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının farklı olduğu ifade edilmektedir. Nitrit ve nitratın biyolojik aktiviteleri yoktur, ancak endojen NO yapımını yansıtan birer göstergedirlere (Amanvermez 1997).

Bitkinin nitrik oksiti temizleme etkisi Marcocci vd. (1994)'nin metoduna göre ölçüldü. Bu metotta sodyum nitroprussiyat sulu çözeltilerde ve fizyolojik pH'da kendiliğinden NO üretmekte ve bu NO radikali de ortamdaki oksijenle etkileşime girerek nitrit (NO_2^-) iyonlarını üretmektedir. Oluşan nitrit Griess reaksiyonuyla renklendirilerek 570nm'de absorbansı ölçülerek ortamdaki NO tayin edilebilmektedir.

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan ekstre çözeltilerinden 4mL alınarak test tüplerine ilave edildi. Üzerine 1mL fosfat tuzu tamponunda (pH 7,4) hazırlanmış sodyum nitroprussiyat çözeltisi (10mM) eklenerek 3saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 0,5mL çözelti başka bir deney tüpüne aktarılarak 0,5mL Griess reaktifi ile karıştırıldı (Griess reaktifi, %5’lik fosforik asit (H₃PO₄) içerisinde hazırlanmış %1 sulfanilamid ve %0,1 naftiletilen diamin dihidroklorür içermektedir). Karışımın absorbansı spektrofotometrede 570nm’de okundu. Standart olarak değişik konsantrasyonlarda hazırlanan sodyum nitrit (NaNO₂) çözeltisi kullanıldı.

5.2.11 Süperoksit radikali süpürme aktivitesi

Asphodelus aestivus Brot. yaprak ekstralarının süperoksit anyonunu süpürme aktivitesi Liu vd. (1997)’nin geliştirdiği metodla ölçüldü. Süperoksit anyonları, non-enzimatik fenazın metasülfat-nikotinamid adenin dinükleotid (PMS-NADH) sisteminde NADH’ın oksidasyonu ve nitroblue tetrazolium (NBT)’un indirgenmesiyle ölçülmektedir.

Bu denemede süperoksit anyonu, 3mL Tris-HCl tamponu (16mM, pH 8,0), 1mL NBT çözeltisi (50µM), 1mL NADH çözeltisi (78µM) ve ekstraların değişik konsantrasyonlarıyla oluşturuldu. Karışıma 1mL PMS çözeltisi (10µM) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon karışımı 25°C’de 5 dakika inkübe edilerek spektrofotometrede 560nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Değişik konsantrasyonda epikateşin, BHA ve trolox standart çözelti olarak kullanıldı.

Süperoksit radikali % inhibisyonu aşağıdaki formülle hesaplandı.

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

A₀: Kontrol absorbansı

A₁: Ekstre veya standart absorbansı

5.2.12 Hidrojen peroksit süpürme aktivitesi

Bitki ekstraları değişik konsantrasyonlar (20-100µg/mL) olacak şekilde 3,4mL 0,1M fosfat tamponu (pH 7,4) içerisinde çözüldü ve üzerine 0,6mL 43mM hidrojen peroksit çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Reaksiyon karışımı 40 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra

230nm'de absorbansı okundu (Ruch vd 1989). Aynı konsantrasyonlardaki α -Tokoferol, BHA ve BHT (20-100 μ g/mL) standart antioksidanlar olarak kullanıldı. Sonuçlar standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Örneklerin hidrojen peroksit süpürme yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\%H_2O_2 \text{ süpürme} = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$$

A₀: Kontrol absorbansı

A₁: Ekstre veya standart absorbansı

5.2.13 Hidroksil radikali süpürme aktivitesi

Hidroksil radikalinin etkisi, 2-deoksiriboz oksidasyon metodu kullanılarak ölçüldü (Chung vd. 1997). 2-Deoksiriboz hidroksil radikali ile oksitlenerek Fenton reaksiyonu ile malondialdehide indirgenir.

Tüplere konan reaksiyon karışımı, 0,45mL 0,2M sodyum fosfat tamponu (pH 7,4), 0,15mL 10mM 2-deoksiriboz, 0,15mL 10mM FeSO₄-EDTA, 0,15mL 10mM hidrojen peroksit, 0,525mL distile su ve 0,075mL değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış ekstre veya standart antioksidan çözeltilerden oluşmaktadır. Reaksiyon, hidrojen peroksit eklenmesiyle başlamakta ve 37°C'de 4 saat inkübasyondan sonra 0,75mL %2,8 trikloroasetik asit ve 0,75mL %1,0 tiyobarbiturik asit eklenmesiyle reaksiyon durdurulmaktadır. Reaksiyon karışımı 10 dakika kaynar su banyosunda, ardından buz banyosunda bekletildikten sonra 520nm'de absorbansı ölçüldü. Ekstre veya standart antioksidan katılmadan hazırlanan örnekler kontrol olarak kullanıldı.

Hidroksil radikali süpürme aktivitesi (HRSA) aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$HRSA = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$$

A₀: Kontrol absorbansı

A₁: Ekstre veya standart absorbansı

5.2.14 DMPD^{•+} radikali süpürme aktivitesi

DMPD radikal süpürme aktivitesi Fogliano vd. (1999)'nin metodu kullanılarak yapıldı. Bu metoda göre öncelikle DMPD^{•+} radikali oluşturuldu. 1mL 100mM DMPD çözeltisi üzerine 100mL 0,1M asetat tamponu (pH 5,3) ve 0,2mL 0,05M FeCl₃ ilave edilerek radikal oluşturuldu. Hazırlanan radikalden 1mL alınarak üzerine değişik konsantrasyonlarda bitki ekstresi veya standart çözeltilerden eklendi. 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 505nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Örnek veya standart çözeltiler eklenmeden distile su ile hazırlanan örnekler kontrol denemeyi oluşturdu.

DMPD^{•+} radikali süpürme aktivitesi = $[(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$ formülüne göre hesaplandı.

A₀: Kontrol absorbansı

A₁: Ekstre veya standart absorbansı

6. SONUÇLAR

6.1 Toplam flavonoid içeriğinin tayini

Flavonoidler bitkilerdeki polifenollerin en önemli grubudur. Antioksidan ve radikal süpürücü olarak bilinirler. Bitkilerin antioksidan aktivitesi toplam flavonoid içeriği ile ilişkilidir. *Asphodelus aestivus* Brot. yapraklarından elde edilen ekstrelerin toplam flavonoid içeriği Çizelge 6.1.'de gösterilmiştir. Sonuçlar her bir mg ekstre için flavonoidlerin kateşin eşdeğeri olarak verilmiştir. Toplam flavonoid içeriği aseton ekstresinde en yüksek değerde bulunmuştur ($17,74 \pm 0,46$ μg kateşin/mg ekstrakt). Etanol ekstresi ise en düşük flavonoid oranına sahiptir ($1,46 \pm 0,01$ μg kateşin/mg ekstrakt).

Çizelge 6.1 *Asphodelus aestivus* Brot. yapraklarından elde edilen ekstrelerin toplam flavonoid, toplam klorofil ve toplam karotenoid içeriği

Örnek*	Toplam Flavonoid (μg kateşin/mg ekstre) ^a	Klorofil a ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Klorofil b ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Toplam Klorofil ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Toplam Karotenoid ($\mu\text{g/mL}$) ^a
Su	$3,57 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,06$	$2,14 \pm 0,12$	$3,20 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,008$
Etanol	$1,46 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,02$	$1,96 \pm 0,04$	$2,98 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,020$
Metanol	$2,30 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,02$	$2,88 \pm 0,07$	$4,39 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,002$
Aseton	$17,74 \pm 0,46$	$10,26 \pm 0,72$	$6,10 \pm 0,003$	$16,36 \pm 0,72$	$1,73 \pm 0,008$

*Ekstrelerin konsantrasyonu : 10 mg/mL

^aSonuçlar üç denemenin ortalaması alınarak verilmiştir (\pm standart sapma).

6.2 Toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin tayini

Klorofil a, klorofil b ve karotenoidler bitkilerin polifenolik olmayan bileşenleridir. Pigmentlerin önemli bir grubunu oluştururlar. Tüm bu pigmentlerin belirli antioksidan aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. *Asphodelus aestivus* Brot. yapraklarından elde edilen

ekstrelerin toplam klorofil ve karotenoid içerikleri Çizelge 6.1.'de verilmiştir. Bitkinin aseton ekstresinin -etanol, metanol ve su ekstraktları ile karşılaştırıldığında- en yüksek toplam klorofil ve karotenoid içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

6.3 Antosiyanin tayini

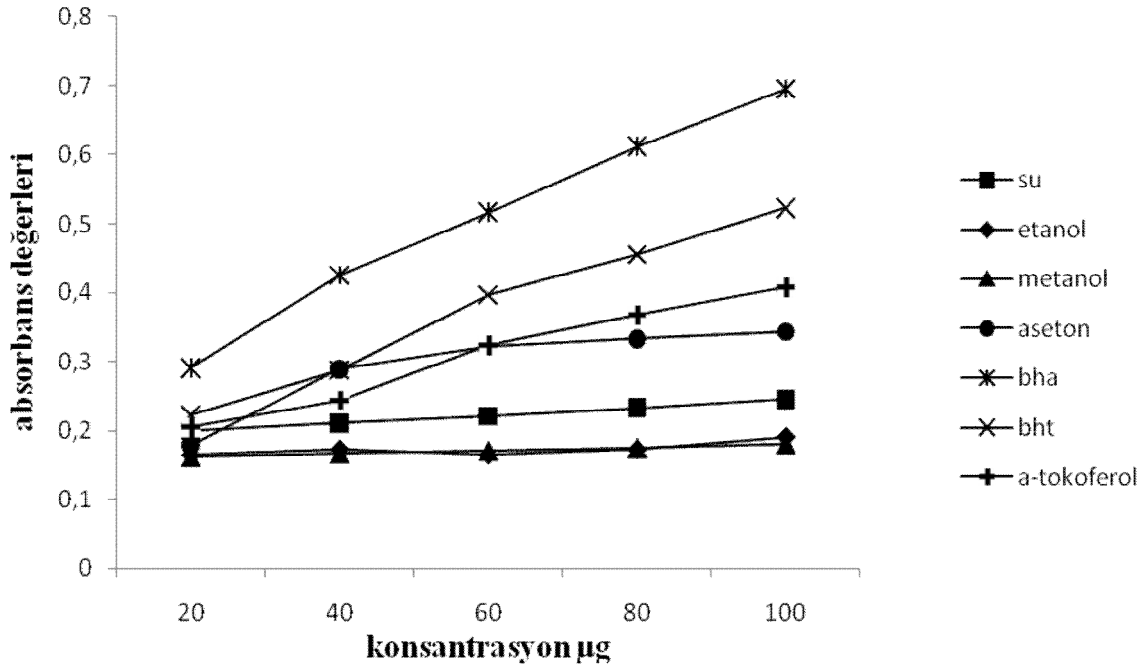
Antosiyaninler, antioksidan flavonoidlerin çok yaygın olan bir çeşididir. Bir çok bitkiye renk veren bileşiklerdir. Besinlerle alınan antosiyaninler oksidatif hasara karşı vücudu korur ve oksidatif stresin neden olduğu hastalıkların risklerini en aza indirir. *Asphodelus aestivus* Brot. yapraklarının antosiyanin içeriği $0,957 \pm 0.009$ $\mu\text{mol/g}$ bitki olarak bulunmuştur.

6.4 Prolin analizi

Prolin, proteinlerin yapısına giren yirmi amino asitten biridir. Bitkilerin prolin içeriği, pentoz-fosfat yolunun uyarılmasının bir göstergesidir. Pentoz fosfat yolu, NADPH₂'yi okside eden sitosolik prolinin sentezi tarafından düzenlenir. Yüksek prolin konsantrasyonu pentoz fosfat yolunu ve dolayısıyla fenolik bileşiklerin sentezini indükler. Yüksek prolin içeriğine sahip bitkiler, fenolik bileşikleri yüksek miktarlarda bulundurur. Bundan dolayı yenilebilen bitkilerin prolin içeriği onların antioksidan kapasitelerinin bir göstergesi olarak kabul edilir. *Asphodelus aestivus* Brot. yapraklarının farklı ekstraktlarının prolin içeriği su, metanol, etanol ve aseton ekstraktları için sırasıyla; 1,02; 0,99; 0,85 ve 0,12 μg prolin/mg ekstre olarak bulunmuştur.

6.5 İndirgeme Gücü

Bu testte *Asphodelus aestivus*'un değişik konsantrasyondaki ekstraktlarının ortama eklenen Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirgeme kapasitesini araştırmak için, standart antioksidanlarla karşılaştırılarak indirgeme gücü test edildi. Sonuçlar paralel üç denemenin ortalaması olarak Şekil 6.1'de gösterilmiştir. En iyi aktiviteyi aseton ekstraktında elde etmiş olup, bunu sırası ile su, etanol ve metanol ekstraktları takip etmiştir. Aseton ekstresi, doğal bir antioksidan olan α -tokoferole yakın sonuç vermiştir. Ekstraktlar standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında en yüksek indirgeme gücünü BHA'nın oluşturduğunu, bunu BHT, α -tokoferol, aseton, su, etanol ve metanolün takip ettiğini elde edilen sonuçlar göstermiştir.

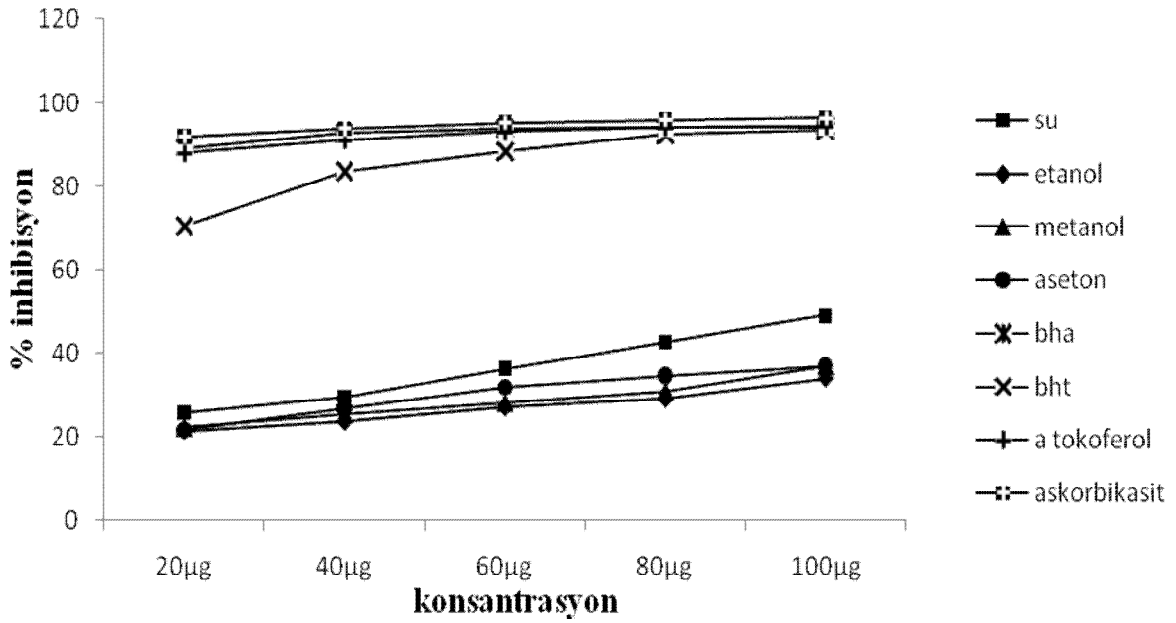


Şekil 6.1 *Asphodelus aestivus* Brot. ekstrelerinin indirgeme gücü

6.6 DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi

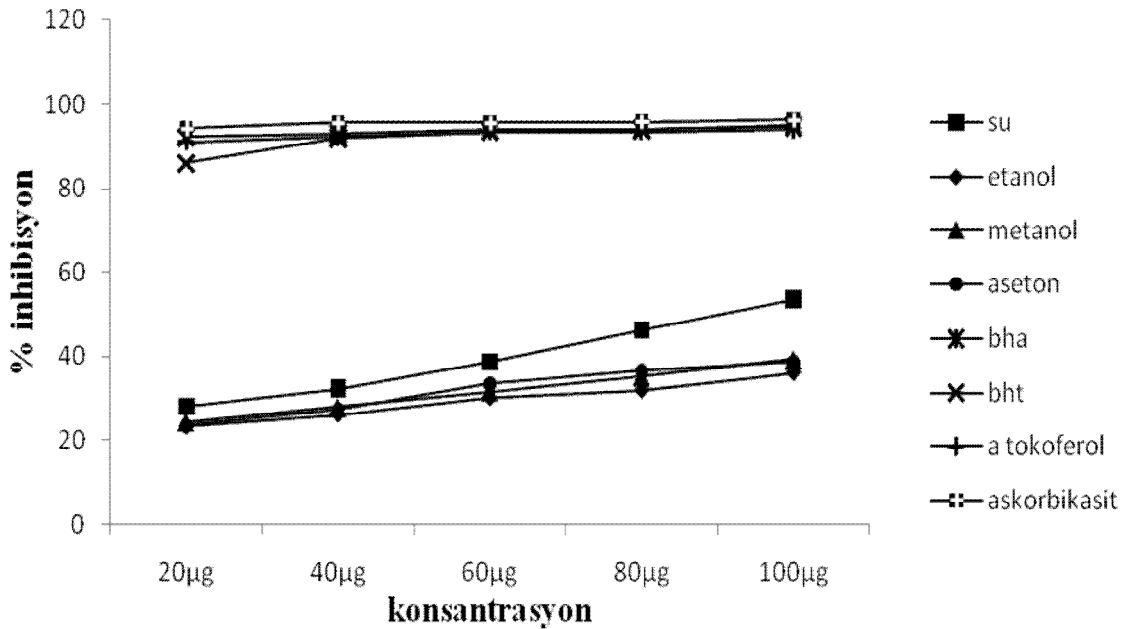
Asphodelus aestivus ekstraktlarında DPPH radikali süpürme aktivitesi için, her bir ekstrakt ve standart üç ayrı deneme olarak, farklı zaman (15', 30' ve 60') aralığında incelendi ve % inhibisyon sonuçları aşağıdaki farklı zaman grafiklerinde gösterildi.

15 dakika inkübasyondan sonra ekstratlerden en iyi sonucu su ekstresi vermiştir. Bunu sırasıyla aseton, metanol ve etanol ekstraktları takip eder. Standart antioksidanların düşük konsantrasyonda aktivitelerinde farklılıklar olmasına rağmen, konsantrasyon arttıkça aktiviteleri birbirine eşitlenmekte ve sabitlenmektedir. Bitki ekstraktlarında ise konsantrasyonun artmasıyla doğru orantılı olarak aktivite de artmaktadır.



Şekil 6.2.1 Ekstrelerin 15 dakika inkübasyondan sonra DPPH radikalini temizlenme aktivitesi

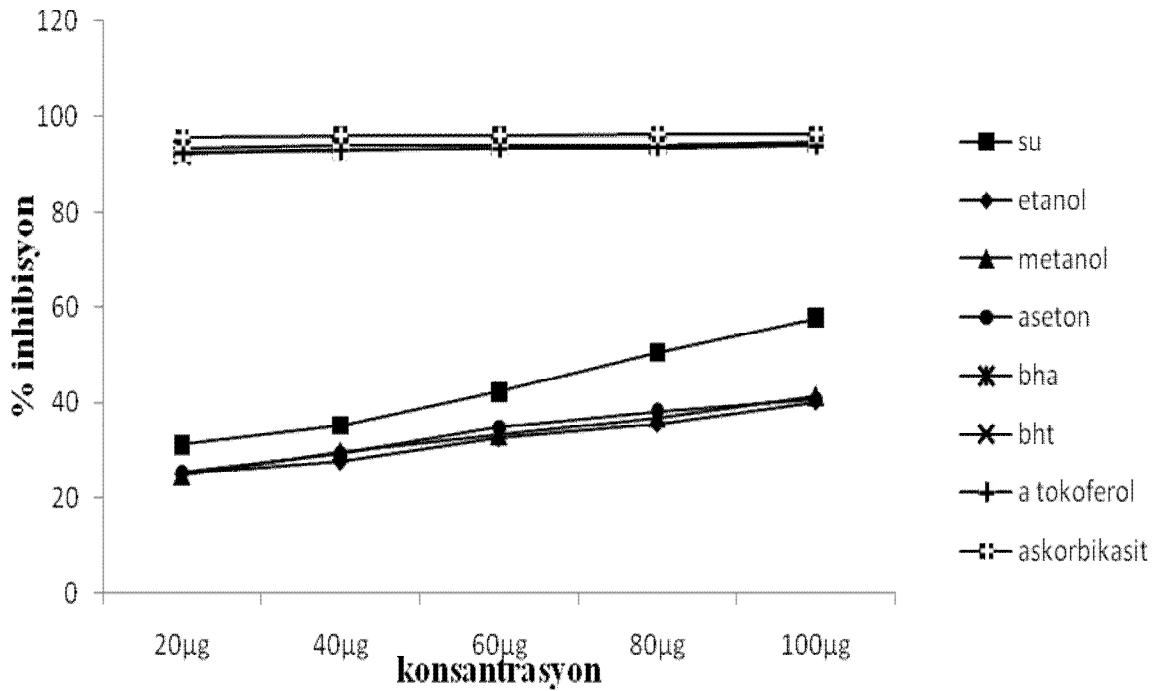
30 dakika inkübasyondan sonra ekstraktlardan en iyi sonucu yine su ekstresinde almış olup, bunu aynı şekilde aseton, metanol ve etanol takip etmektedir.



Şekil 6.2.2 Ekstrelerin 30 dakika inkübasyondan sonra DPPH radikalini temizleme aktivitesi

60 dakika inkübasyondan sonra su ekstresi yine en iyi sonucu vermiştir, diğer ekstrelerin sonuçları birbirine yakın çıkmıştır.

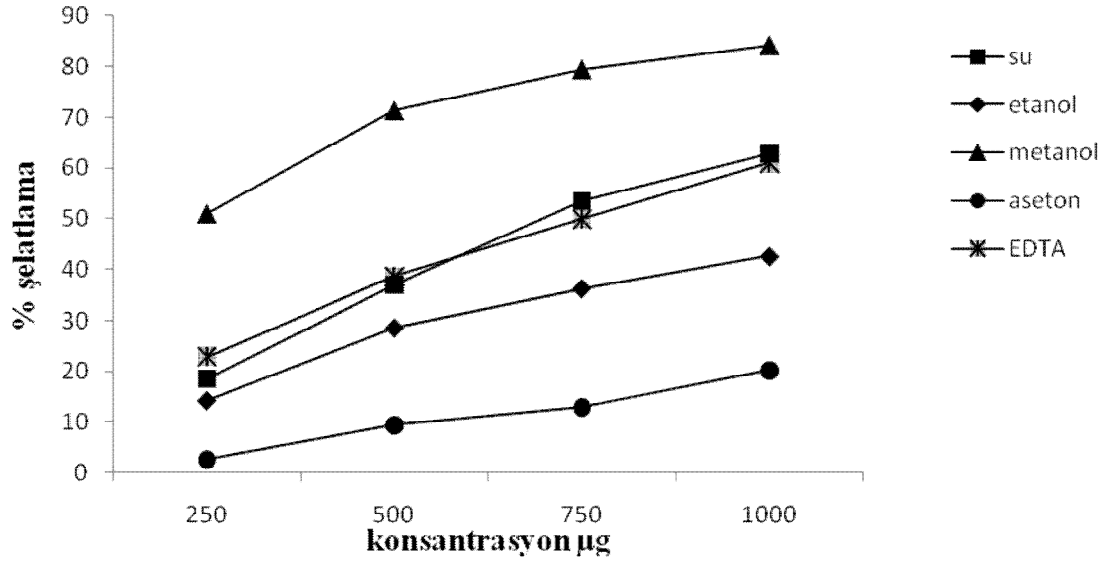
Bitki ekstralarının aktivitelerinde zamanla belirgin olmayan çok az artış gözlenmekte, bu da aktivitenin zamana göre değil konsantrasyon miktarıyla doğru orantılı şekilde arttığını göstermektedir.



Şekil 6.2.3 Ekstrelerin 60 dakika inkübasyondan sonra DPPH radikalini temizleme aktivitesi

6.7 Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesini en yüksek metanol ekstresi göstermiş olup, bunu sırasıyla su, etanol ve aseton takip etmektedir. Kuvvetli bir şelat oluşturucu olarak bilinen EDTA ile karşılaştırıldığında su ekstresinin EDTA'ya oldukça yakın sonuç verdiği, fakat metanol ekstresinin her ikisinden de daha yükseğe sahip olduğu bulunmuştur.

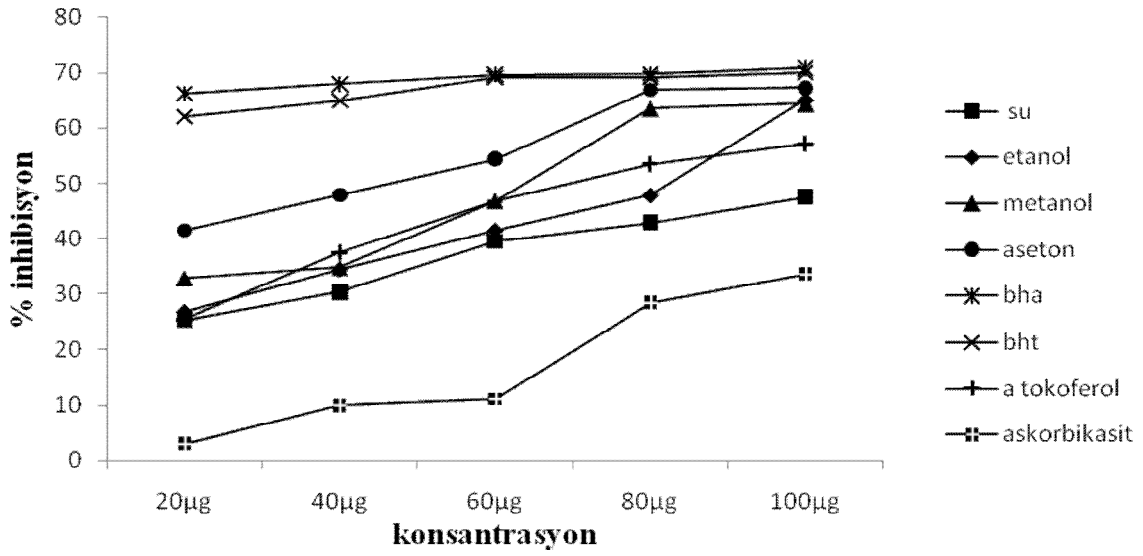


Şekil 6.3 Ekstrelerin değişen konsantrasyonda metal şelatlama aktivitesi

6.8 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

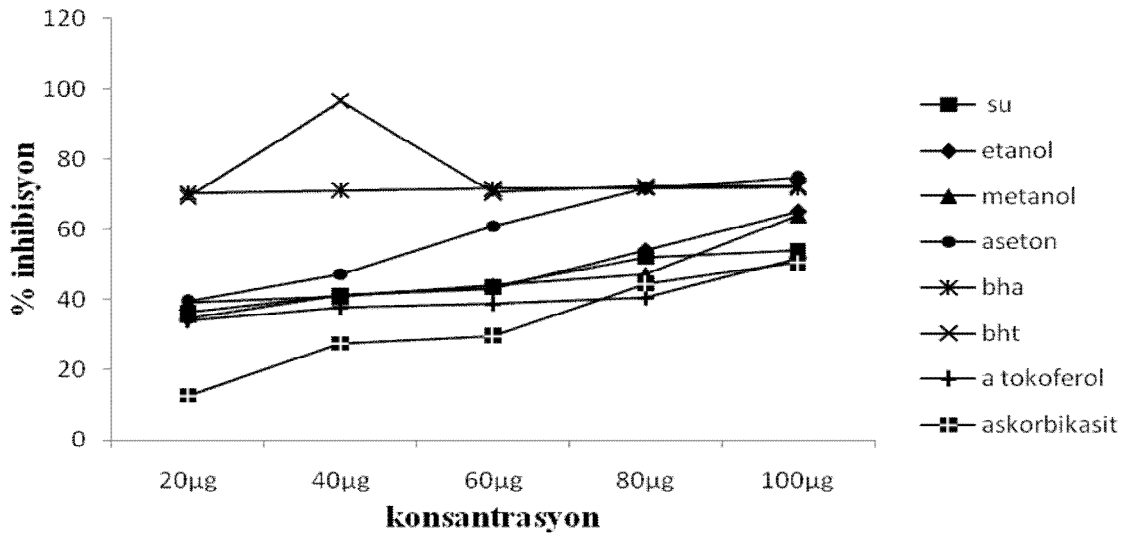
Total antioksidan aktivitesi için 4 gün boyunca 24 saat aralıklarla ölçüm alınarak aktivite tayin edildi.

İlk 24 saat sonunda aseton ekstresinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu görölmüş, bunu sırasıyla metanol, etanol ve su ekstraktları izlemiştir. Aseton ekstresinin aktivitesi standart antioksidan olan BHA ve BHT'nin aktivitesine oldukça yakın, askorbik asit ve a tokoferolden de yüksektir.



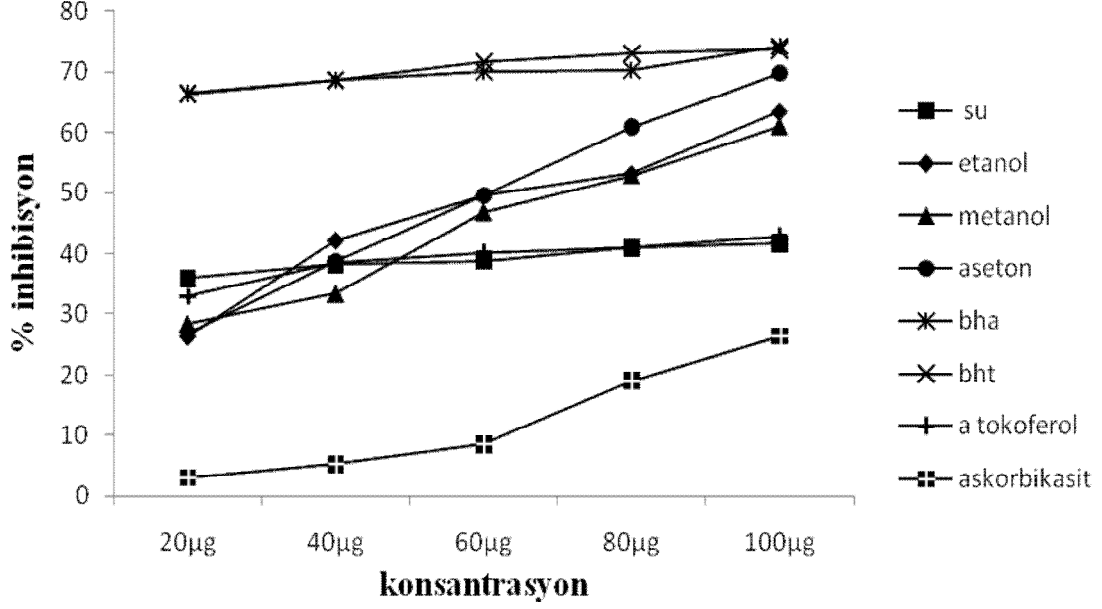
Şekil 6.4.1 İlk 24 saatin sonunda total antioksidan aktivitesi

48 saatin sonunda total antioksidan aktivitesi sonuçları ilk 24 saatin sonuçlarına yakın fakat yer yer farklılıklar göstermektedir. Ekstrelerde en yüksek aktiviteyi yine asetonda görmekte beraber, bunu sırasıyla etanol, metanol ve su takip etmektedir. Aseton ekstresi artan konsantrasyonuyla birlikte BHA ve BHT'den daha yüksek aktivite göstermekte, α tokoferol ve askorbik asitin aktivitesinin artmasına rağmen tüm ekstralar daha yüksek aktivite göstermektedir.

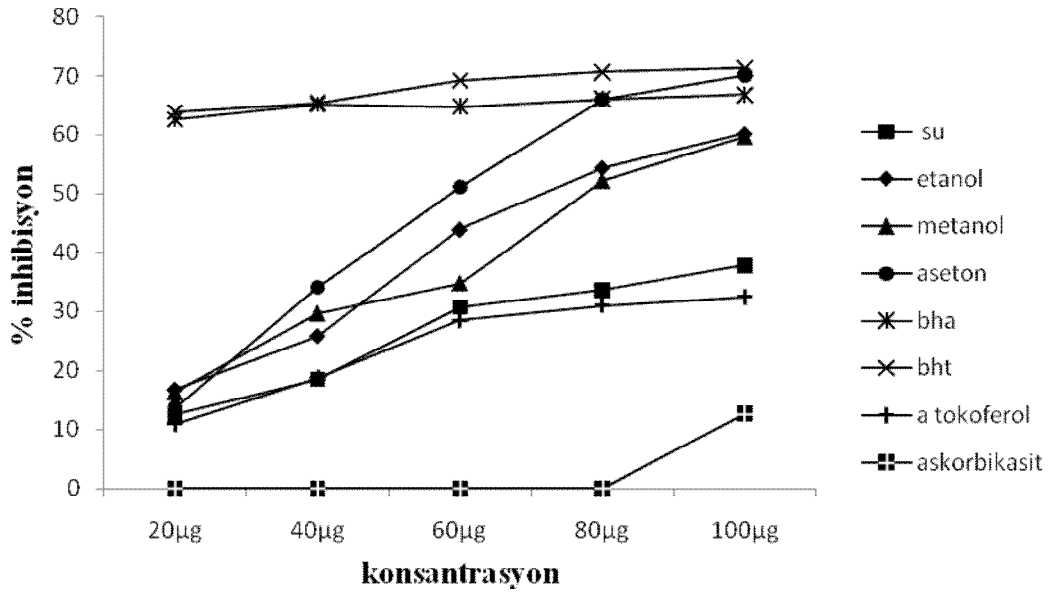


Şekil 6.4.2 İkinci gün-48 saatin sonunda total antioksidan aktivitesi

72 saatin sonunda ekstrelerden yine en yüksek aktiviteyi aseton ekstresi vermekte ve sırasıyla etanol, metanol, su takip etmektedir.



Şekil 6.4.3 Üçüncü gün-72 saat sonunda total antioksidan aktivitesi

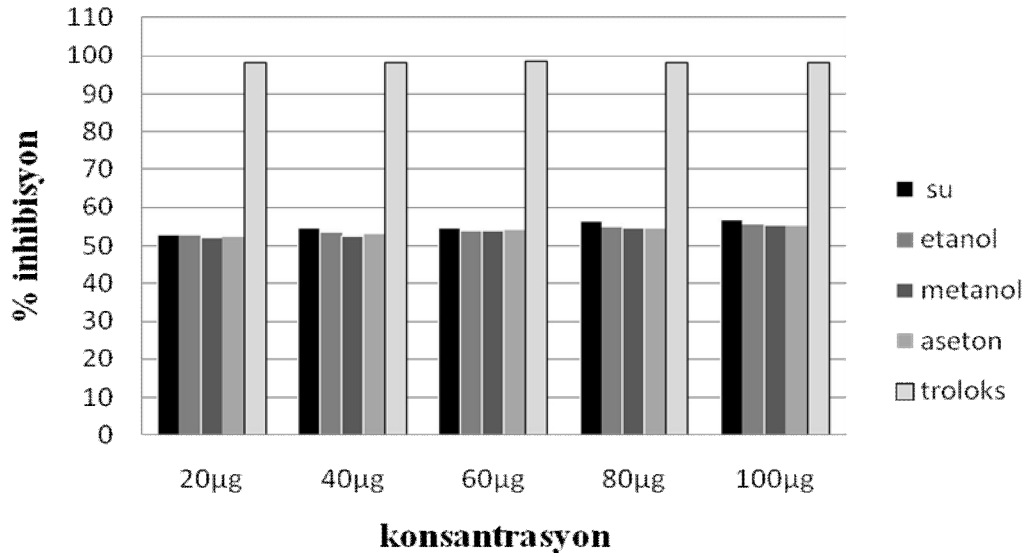


Şekil 6.4.4 Dördüncü gün-96 saat sonunda total antioksidan aktivitesi

96 saat sonunda da durum değişmemekte ve ekstrelerden en yüksek aktiviteyi aseton ekstraktında görmekte, bunu sırasıyla etanol, metanol ve su ekstraktları takip etmektedir. Aseton ekstraktı yüksek konsantrasyonda BHA'dan daha yüksek aktivite göstermektedir ve bulunan sonuçlar BHT'ye de oldukça yakındır. Askorbik asitin zamanla yapısında bozulmalar meydana gelmesinden dolayı aktivitesi her geçen gün düşmekte ve 4.günün sonunda yüksek konsantrasyonda aktivitesi sıfıra inmektedir.

6.9 ABTS⁺ radikal süpürme aktivitesi

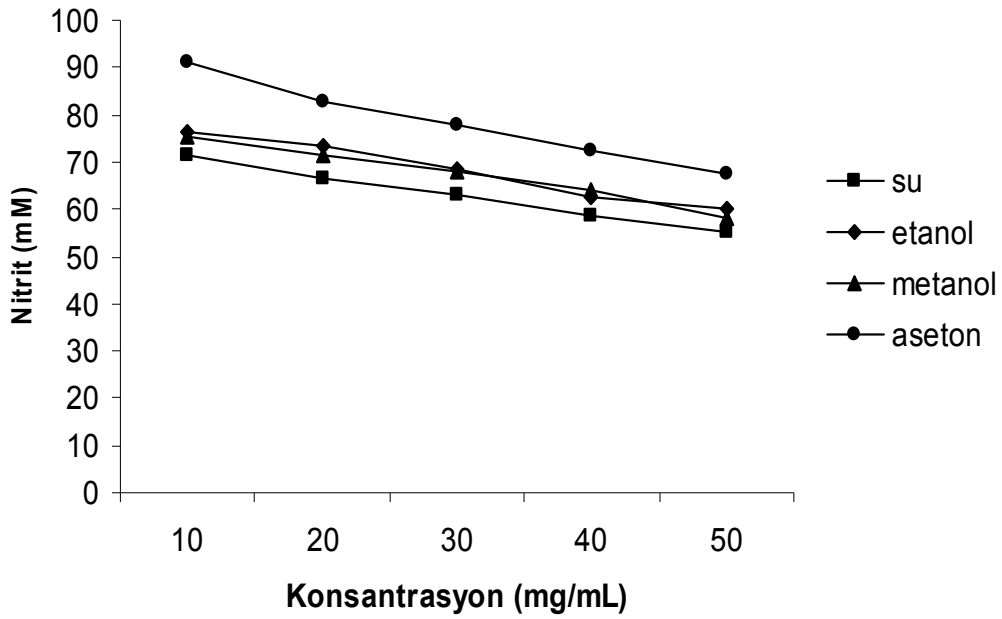
ABTS radikali süpürme aktivitesinde tüm ekstraktlar birbirine yakın sonuç vermekte ve %50 ila %60 arasında ABTS radikalini ortamdaki uzaklaştırmaktadır. Ekstraktlardan en yüksek sonucu su ekstraktı vermiş olup, tüm ekstraktlarda belirgin bir fark görülmemiştir. Ayrıca konsantrasyonun artmasıyla belirgin bir fark oluşmamış olup, inhibisyon yüzdesini etkilememektedir.



Şekil 6.5 Ekstrelerin ABTS radikalini temizleme aktivitesi

6.10 Nitrik oksit radikal süpürme aktivitesi

Asphodelus aestivus Brot. yapraklarından elde edilen ekstrelerin nitrik oksit radikal süpürücü etkisi Şekil 6.6' da gösterilmiştir. Nitrik oksit, inkübasyon esnasında sodyum nitroprussiyat ile oluşturulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre ekstrelerin nitrik oksit süpürücü etkisi konsantrasyona bağlıdır ve en etkili ekstre aseton ekstresi olarak bulunmuştur.

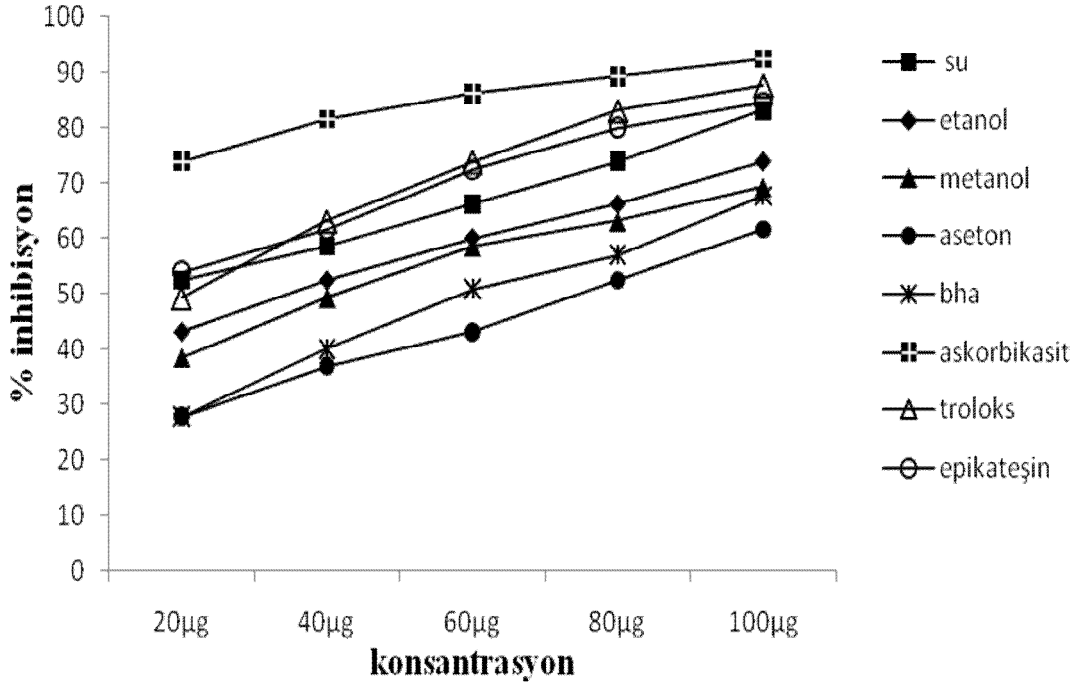


Şekil 6.6 Ekstrelerin nitrik oksit radikal süpürücü aktivitesi

6.11 Süperoksit radikali süpürme aktivitesi

Ekstraktlar en yüksek aktivite suda görülmüş olup, bunu sırasıyla etanol, metanol ve aseton takip etmektedir. Su ekstraktının aktivitesi troloks ve epikateşine yakın ve BHA'dan oldukça yüksektir.

Her bir ekstraktın konsantrasyonunun artmasıyla aktivite doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu durum bitki ekstraktlarının süperoksit radikallerini yüksek oranda ortamdan uzaklaştırabildiklerini ve zararlarını etkisiz hale getirebildiklerini göstermektedir.

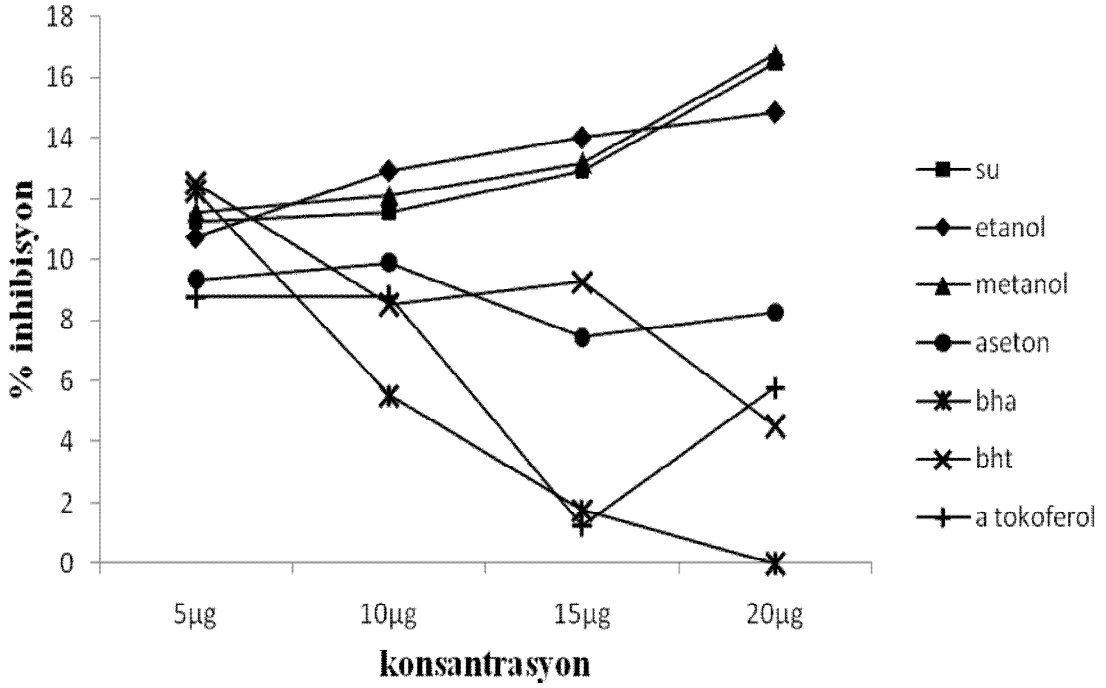


Şekil 6.7 Ekstrelerin süperoksit radikalini temizleme aktivitesi

6.12 Hidrojen peroksit süpürme aktivitesi

Ekstraktlardan en yüksek aktivite metanol ve su ekstraktlarında görülmüş olup, süpürme aktiviteleri birbirlerine çok yakın ve paraleldir. Onları takiben etanol ve aseton ekstraktları gelmektedir.

Düşük konsantrasyonda tüm ekstraktlar α -tokoferolden yüksek aktivite göstermiş olup, BHA ve BHT'ye yakındır. Ancak standart antioksidanlarda konsantrasyon artmasıyla ters orantılı olarak aktivite düşmektedir.

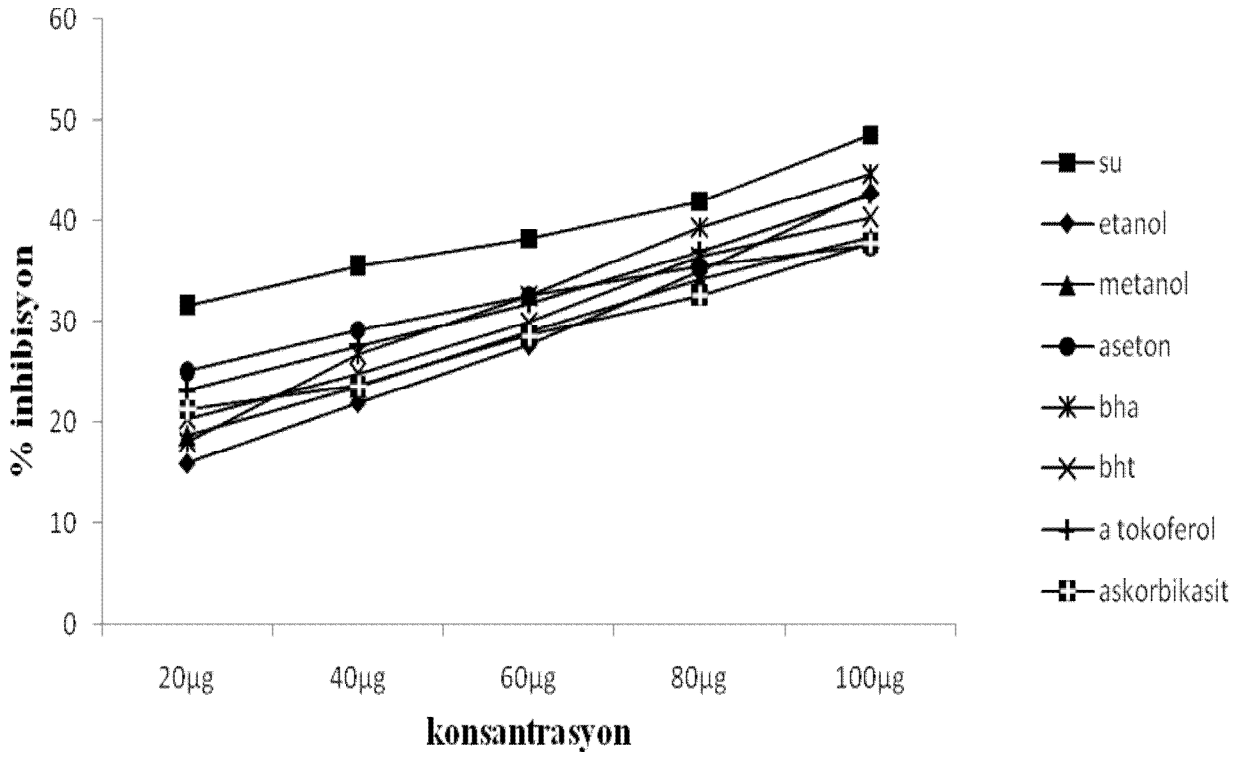


Şekil 6.8 Ekstrelerin hidrojen peroksiti süpürme aktivitesi

6.13 Hidroksil radikali süpürme aktivitesi

Hidroksil radikali oldukça reaktif ve metabolizma için son derece zararlıdır. Hidroksil radikalini süpürme aktivitesini ekstraktlardan en yüksek su ekstraktında görmüş olup, düşük konsantrasyonda bunu takiben aseton, metanol ve etanol görülmektedir. Konsantrasyon arttıkça sıralama değişmekte ve yüksek aktiviteden düşük aktiviteye doğru sıralama şöyle olmaktadır; su, etanol, metanol ve aseton.

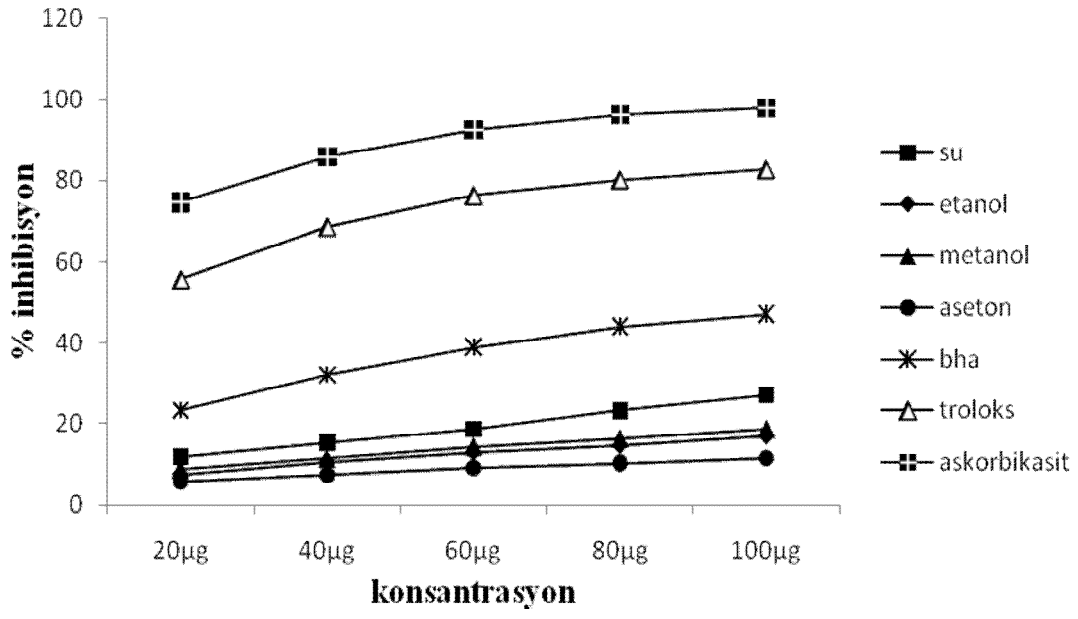
Standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında ise düşük konsantrasyonda yine su ekstraktının en yüksek aktiviteyi gösterdiğini ve bunu aseton, α -tokoferol, askorbik asit, BHT, metanol=BHA ve etanol şeklinde sıralandığını, ancak konsantrasyonun artmasıyla sıralamanın değiştiğini ve yüksek aktiviteden düşük aktiviteye doğru; su, BHA, etanol= α -tokoferol, BHT, metanol= aseton=askorbik asit şeklinde olduğunu görmekteyiz.



Şekil 6.9 Ekstrelerin hidroksil radikalini temizleme aktivitesi

6.14 DMPD^{•+} radikali süpürme aktivitesi

DMPD radikalini süpürmede ekstraktlardan en iyi aktiviteyi su ekstraktında, bunu takiben metanol, etanol ve aseton ekstraktlarını görmekteyiz. Konsantrasyonun artması aktiviteyi de doğru orantılı şekilde arttırmıştır. Standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında su ekstraktının aktivitesi BHA'ya yakındır. Askorbik asitin aktivitesi %98 olup, tüm örnekler karşılaştırıldığında yüksek aktiviteden düşük aktiviteye doğru sıralanma şu şekildedir; askorbik asit, troloks, BHA, su, metanol, etanol ve aseton.



Şekil 6.10 Ekstrelerin DMPD radikalini temizleme aktivitesi

7. TARTIŞMA

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen, serbest radikallerle reaksiyona girerek oto-oksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini ve zarar vermesini önleyen kimyasal maddelerdir. Serbest radikaller, dış yörüngelerinde çiftlenmemiş elektronlara sahip, yüklü veya yüksüz, atomsal ya da moleküler yapılardır. Çiftlenmemiş yapılarından dolayı oldukça reaktif ve zararlı bileşiklerdir. Antioksidanlar serbest radikallerin zararlarını etkisiz hale getiren savunma mekanizmalarıdır. Serbest radikaller metabolik olaylar sırasında oluştuğu gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Bu dış etkenler, sigara dumanı, hava kirliliği, endüstri atıkları, UV ışınları, radyasyon ilaçlar ve çeşitli kimyasallardır. Çevreden alınan toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini arttırlar. Kendileri radikal üretir ya da radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi azaltırlar. Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerinin en önemlileri; DNA tahribatı, nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı, tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, protein ve lipidlerde kovalent bağların bozulması, enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler, mukopolisakkaritlerin yıkımı, proteinlerin tahrip olması, lipid peroksidasyonu ile hücre zarı yapısı ve fonksiyonunun değişimi, zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması, steroid ve yaş pigmentlerinin birikimi, kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon reaksiyonlarının bozularak kapilerdeki aterosklerotik değişikliklerin oluşması sayılabilir. Antioksidanlar organizma tarafından sentezlenir veya besinlerle alınabilir. Antioksidanlar bakımından zengin gıdalar, kalp hastalıkları, çeşitli kanser tipleri, Parkinson ve Alzheimer ve iltihaplı hastalıkların yanısıra yaşlanma ile oluşan tüm hücresel sorunların önlenmesinde etkin rol oynamaktadır.

Radikal temizleme ve zincir reaksiyonları durdurma özelliğine sahip olarak üretilen sentetik antioksidanlar özellikle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. BHA, BHT gibi sentetik antioksidanlar 20. yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak yüksek dozlarının toksik olduğu ve kansere yol açabileceğini gösteren çalışmalar sonucunda bu antioksidanların kullanımına sınırlamalar getirilmiştir. Bu durum doğal antioksidanlara verilen önemi artmıştır. Bitkilerin sekonder metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu özellikler taşırlar. Özellikle renkli meyva ve sebzeler, bitkiler yüksek oranda içerdikleri

flavonoidler, antosiyaninler ve fenolik bileşikler nedeniyle oldukça iyi birer doğal antioksidan kaynağı olarak ilgi çekmektedirler.

Bu çalışmada halk ilacı olarak kullanılan *Asphodelus aestivus* Brot. (çiriş otu) bitkisinin toprak üstü kısımları olan yapraklarından, farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerde farklı antioksidan aktivite testleri çalışılarak bitkinin antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışma çiriş otu bitkisinin antioksidan aktivite yönünden incelendiği ilk çalışmadır. Literatürde bu bitki ile yapılan bu türde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre bitki, yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bitkinin aseton ekstresi yüksek oranda flavonoid karotenoid ve klorofil içermektedir. Su ekstresi ise bitkilerde fenolik bileşiklerin sentezi ile yakın ilişkili olan prolini yüksek oranda bulundurmaktadır. Aseton ve su ekstresinin indirgeme gücü yüksek olup aseton ekstresi doğal antioksidan olan α -tokoferolün indirgeme gücüne yakın sonuç vermiştir. Bulunan değer, *Portulaca oleraceae* (semizotu)'nun indirgeme gücünden daha yüksektir (Peksel vd., 2006). Bitkinin metal şelatlama kapasitesi metanol ve su ekstreleri için oldukça yüksektir. Toplam antioksidan yakalama aktivitesi için metanol, etanol ve su ekstreleri sentetik antioksidanlar olan BHA ve BHT'ye yakın sonuçlar sergilemiştir. Ekstrelerin tümü ABTS radikaline karşı %50'ye varan inhibisyon göstermiştir. Farklı bitkiler için benzer sonuçlar literatürde mevcuttur (Yen vd. 2006). NO radikali üzerine etki yine ekstrelerin tümünde gözlenmiştir. Etanol, metanol ve su ekstreleri hidrojen peroksit üzerinde BHA ve BHT'den daha fazla etkilidir. Bu sonuç benzer raporlar bildirilmiştir (Kumaran ve Karunakaran, 2007; Ku ve Mun, 2008). Su ekstresi hidroksil radikali giderilmesinde doğal ve sentetik antioksidanlardan daha güçlüdür. Ayrıca DMPD ve DPPH radikallerinin süpürülmesinde de su ekstresi en çok etkiye sahiptir. Etanol ekstresi ise süperoksit radikaline karşı BHA'dan daha iyi sonuç vermiştir.

Çalışmadan elde edilen bütün bu sonuçlara göre; *Asphodelus aestivus* Brot. yaprakları farklı polaritede bileşenler içeren her bir ekstre ile güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Bitkiden hazırlanan ekstreler sentetik antioksidanların yerine kullanılabilir potansiyel bir bitkidir. Bitkinin farklı kısımları da antioksidan aktivite yönünden incelenmeli ve sentetik ve doğal antioksidanlar ile karşılaştırılmalıdır. Ayrıca her bir ekstrenin içerdiği bileşikler belirlenerek antioksidan aktiviteden sorumlu olanlar belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Abdille, Md.H., Singh, P.R., Jayaprakasha, G.K., ve Jena, B.S., (2005), "Antioxidant activity of extracts from *Dillenia indica* fruits", *Food Chemistry*, 90: 891-896.
- Akkuş, İ., (1995), "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", Mimoza yayınları, Konya
- Akpolat, M., (2000), "Alkolün Oluşturduğu Serbest Radikaller Üzerine İbuprofen ve Erusik Asidin Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Altınışik, M., (2000), "Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar", Adnan Menderes Ünv, Aydın.
- Amanvermez, R., (1997), "*Echinococcus granulosus* Hidatik Kistlerinde Oksidanların Etkinliği ve Antioksidan Sistemlerin Araştırılması", Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Ünv, Samsun.
- Arnao, M.B., Cano, A., ve Acosta, M., (2001), "The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity", *Food Chem*, 73: 239-244.
- Bates, S.L., (1973), "Rapid determination of free proline for water stress studies", *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Baytop, T., (1999), "Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi- Geçmişte ve Bugün", Nobel Tıp Kitapevleri 2.Baskı, İstanbul.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., ve Berset, C., (1995), "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- Chung, S.K., Osawa, T., ve Kawakishi, S., (1997), "Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*)", *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 118-123.
- Çavdar, C., Sifil, A., ve Çamsarı, T., (1997), "Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma", Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- Davis, P.H., Mill, R.R., ve Kit, Tan., (1984), "Flora of Turkey and The East Aegea Islands", University of Edinburgh, 8: 85-86.
- Decker, E.A., ve Welch, B., (1990), "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food", *J. Agr. Food Chem*, 38: 674-677.
- Devlin, T.M., (1992), "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations", 1115-1144.
- Diri, M., (2006), "*Coridothymus capitatus (L.) Reichb.* Uçucu Yağlarının Analizi, Su ve Etanol Ekstratlarının Antioksidan Aktivitekerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla.

- Dröge, W., (2002),“Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function”, Germany.
- Ekinci, A.P., (2008), “Erzincan Üzümünün (*Vitis vinifera ssp. Cimin*) Farklı Dokularına Ait Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin İn Vitro İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- Erkan, N., Ayrancı, G., ve Ayrancı, E., (2008), “Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol”, *Food Chemistry* 100: 76-82.
- Fogliano, V., Verde, V., ve Randazzo, G., (1999), “Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines”. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47: 1035-1040.
- Gürhan, G., ve Ezer,N., (2004), “Halk Arasında Hemoroit Tedavisinde Kullanılan Bitkiler-1”, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 24: 37-55.
- Tello, S., Halifeoğlu, İ., Bozkurt, M., ve Bulmuş, Ö., (2008), “Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda Isırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi”, *Fırat Üniv, Sağlık Bil. Dergisi*, 22 (4): 179-183
- Halliwell, B., ve Gutteridge, J.M.C., (1984), “Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease”, *Biochemical Journal*, 219: 1-14.
- Halliwell, B., (1991), “Reactive oxygen species in living systems”, *Biochemistry and Role in Human Disease*, *Am.J.Med.* 91: 22.
- Handa, S.S., Rakesh, D.D., ve Vasisht, K., “Compedium of Medicinal and Aromatic Plants Asia”.
- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Jena, B.S., ve Jagan, M.R.L., (2007), “Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 330-336.
- Kocacaliskan, I., ve Kadioglu, A., (1990), “Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Kılavuzu”, (s 40), Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi yayını, Erzurum.
- Ku, C.S., ve Mun, S.P., (2008), “Antioxidant activities of ethanol extracts from seeds in fresh Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and wine processing waste”, *Bioresour. Technol.* 99, 4503-4509.
- Kumaran, A., ve Karunakaran, R.J.. (2007), “In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India”, *Lebensm. Wiss. Technol.* 40, 344-352.
- Liu, F., Ooi, V.F.C., ve Chang, S.T., (1997), “Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts”, *Life Sci.* 60: 763-771.

- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., ve Packer, L., (1994), "The nitric-oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 748-755.
- Nenadis, N., Zafiropoulou, I., ve Tsimidou, M., (2003), "Commanly Used Food Antioxidants: A Comparative Study in Dispersed Sytems", *Food chemistry* 82 (3) : 403 – 407.
- Osawa, T., ve Namiki, N., (1981), "A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves", *Agr. Biol. Chem.* 45: 735-739.
- Oskay, M., Aktaş, K., Sarı, D., Azeri, C., (2007), "*Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un Antimikrobiyal Etkisinin Çukur ve Disk Diffüzyon Yöntemiyle Karşılaştırmalı Olarak Belirlenmesi", Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.
- Oyaizu, M., (1986), "Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine", *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315.
- Özcankaya, R., ve Delibaş, N., (1995), "Serbest radikaller", Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, T.V., ve Reddy, A.R., (1997), "Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids", *Phytochemistry* 46: 449-502.
- Peksel, A., Arısan-Ataç, I., Yanardag, R., (2006), "Antioxidant activities of aqueous extracts of purslane (*Portulaca oleraceae* subs. *sativa* L.)", *Italian Journal of Food Chemistry*, 3(18), 295-308.
- Pirdal, M., (1986), "Studies on the morphology, anatomy and ecology of *Asphodelus aestivus* distributed in West Anatolia", Ege Üniversitesi, Izmir.
- Pirdal, M., ve Öztürk, M., (1986), "Studies on the germination of *Asphodelus aestivus* Brot.", *Biotronics*, 15: 55-60.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., ve Gordon, M., (2001), "Antioxidants in food", Cambridge.
- Polycarpou, P., (2009), "Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*", *Renewable energy* 34: 2525-2527.
- Prior, R.L., ve Cao, G., (2000), "Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications", *Horticulture Science*, 35: 588-592.
- Ruch, R.T., Cheng, S.J., ve Klawnig, E., (1989), "Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea", *Carcinogenesis* 10: 1003-1008.

Sawidis, T., Kalyva, S., ve Delivopoulos, S., (2005), "The root-tuber anatomy of *Asphodelus aestivus*", Elsevier- Flora 200: 332-338.

Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.P., ve Rai, M., (2006), "Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata)", Scientia Horticulturae, 108: 233-237.

Weryszko-Chemielewska, E., Sawidis, T., ve Piotrowska, K., (2006), "Anatomy and ultrastructure of floral nectaries of *Asphodelus aestivus* Brot. (Asphodelaceae)", Acta Agrobotanica 59 (2): 29-42.

Yağan, B.D., Gönüz, A., ve Ataş, S., (2008), "A Study On Heavy Metal Accumulation By *Asphodelus aestivus* Brot. Taxon and Plant and Soil Texture Features In Tuzla Area, Canakkale-TURKEY", Balwois 27: 1-4.

Yen, G.C., Duh, P.D., Su, H.J., Yeh, C.T., ve Wu, C.H., (2006), "Scavenging effects of lotus seed extracts on reactive nitrogen species", Food Chem. 94, 596-602.

Zhishen, J., Mengcheng, T., ve Jianming, W., (1999), "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals", Food Chem. 64: 555-559.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	01.01.1983	
Doğum yeri	Kızanlık / Bulgaristan	
Lise	1997-2001	İbrahim Turhan Lisesi (Y.D.A)
Lisans	2002-2006	Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2007-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı