

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ BİTKİSEL HALK İLAÇLARININ ANTİOKSİDAN
AKTİVİTE YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ece MİSER

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Sevgi AKAYDIN

ANKARA
Haziran 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ BİTKİSEL HALK İLAÇLARININ ANTİOKSİDAN
AKTİVİTE YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ece MİSER

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Sevgi AKAYDIN

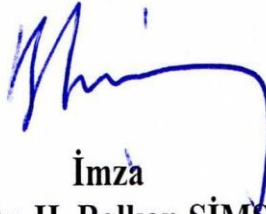
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
02/2010-46 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Haziran 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

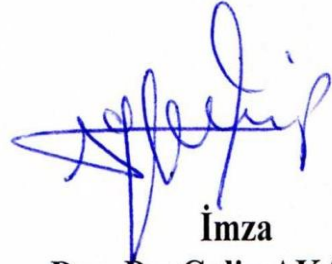
Tez Savunma Tarihi : 27/06/2011



İmza
Prof. Dr. H. Bolkan ŞİMŞEK
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Doç. Dr. Sevgi AKAYDIN
Gazi Üniversitesi



İmza
Doç. Dr. Galip AKAYDIN
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	VI
Tablolar, Resimler	IX
Semboller, Kısaltmalar	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Reaktif oksijen türleri	4
2.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	4
2.1.2.Hidrojen Peroksit H_2O_2	6
2.1.3.Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	6
2.1.4.Singlet Oksijen (O_2^1)	8
2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	8
2.2.1.Endojen Kaynaklar	9
2.2.2.Eksojen kaynaklar	9
2.3.Serbest Radikallerin Etkileri	10
2.3.1.Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	10
2.3.2.Proteinlere Etkileri	11
2.3.3.Lipidler Üzerindeki Etkileri	11
2.4.Antioksidanlar	12
Antioksidan Etki Tipleri	14
2.4.1 Endojen Antioksidanlar	15
2.4.1.1.Enzim Yapısındaki antioksidanlar:	15
Süperoksit Dismutaz (SOD)	15
Katalaz	16
Glutasyon Peroksidaz (GPx)	17
Glutasyon Redüktaz (GR)	17
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	18

Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	18
2.4.1.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	19
Melatonin	19
Ferritin	19
Albümin	19
Sistein	19
Bilirubin	19
Transferrin ve Laktoferrin	20
Ürat	20
Seruloplazmin	20
Mannitol	20
Oksipürinol	20
2.4.2.Eksojen Antioksidanlar	20
Propil Gallat (PG)	21
BHA	21
BHT	22
TBHQ	23
2.4.1.Bitkisel Antioksidanlar	23
Fenolik Bileşikler	24
Vitamin C (Askorbik Asit)	25
Vitamin E (Tokoferol)	26
Vitamin A (β -Karoten)	27
2.5. Çalışılan Bitkiler	27
2.5.1. <i>Rubus hirtus</i> Waldst. & Kit.	27
2.5.2. <i>Sambucus ebulus</i> L.	29
2.5.3. <i>Plantago major</i> L. ssp. <i>major</i>	31
2.5.4. <i>Plantago lanceolata</i>	32
2.5.5. <i>Hedera helix</i> L.	33
2.5.6. <i>Morus alba</i> L.	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1.Materyal	37

3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.1.2.Kullanılan Alet ve Cihazlar	37
3.1.3.Bitkisel Materyal	38
3.2.Yöntem	40
3.2.1.Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması	40
3.2.2.Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	40
3.3.Uygulanan Yöntemler	41
3.3.1 Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenol İçeriği Tayin Yöntemi)	42
3.3.2. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	43
3.3.3. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	44
3.3.4 Lİpid Peroksidasyonunun İnhibisyonu (Tiyosiyanat)	45
3.3.5. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	46
3.3.6. DMPD Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	47
3.3.7. Süperoksit Radikali Giderme	48
3.3.8. Hidrojen Peroksit	49
3.3.9.Total Antioksidan Cevap	49
4. BULGULAR	51
4.1. Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenol İçeriği Tayin Yöntemi)	51
4.2. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	53
4.3. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	55
4.4. Lipid Peroksidasyonunun İnhibisyonu (Tiyosiyanat)	57
4.5. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	59
4.6. DMPD Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	61
4.7. Süperoksit Radikali Giderme	64
4.8.Hidrojen Peroksit İnhibisyonu	67

4.9. Total Antioksidan Cevap	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
6. ÖZET	78
7. SUMMARY	79
8. KAYNAKLAR	80
9. EKLER	98
9.1. TEŞEKKÜR	98
10. ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER

Şekil 1: Serbest Radikal ve Reaktiflerin Oluşumu

Şekil 2: 3,4,5-trihidroksipropilbenzoat (Propil Gallat)

Şekil 3: 2-tertiyerbutil-4-hidroksianisol ve 3-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (BHA)

Şekil 4: 2,6-ditertiaryer bütül-4-metil fenol (BHT)

Şekil 5: 2-(1,1-Dimetiletil)-1,4-benzendiol (TBHQ)

Şekil 6: Folin Metodunda sulu ekstrelerin absorbands-konsantrasyon grafiği

Şekil 7: Folin Metodunda galik asit ile elde edilen standart kalibrasyon grafiği

Şekil 8: Cuprac yöntemi ile elde edilen standart troloksun kalibrasyon grafiği

Şekil 9: Cuprac yöntemi ile elde edilen standart vitamin C'nin kalibrasyon grafiği

Şekil 10: Cuprac yöntemi ile elde edilen sulu ekstrelerin absorbands-konsantrasyon grafiği

Şekil 11: Cuprac yöntemi ile elde edilen EtOH'lı ekstrelerin absorbands-konsantrasyon grafiği

Şekil 12: Cuprac yöntemi ile elde edilen MetOH'lı ekstrelerin absorbands-konsantrasyon grafiği

Şekil 13: ABTS yöntemi ile elde edilen standart vitamin C'nin kalibrasyon grafiği

Şekil 14: ABTS yöntemi ile elde edilen standart gallik asitin kalibrasyon grafiği

Şekil 15: ABTS yöntemi ile elde edilen sulu ekstrelerin absorbands-konsantrasyon grafiği

Şekil 16: ABTS yöntemi ile elde edilen EtOH'lı ekstrelerin absorbands-konsantrasyon grafiği

Şekil 17: Tiyosiyanat yöntemi ile elde edilen standart gallik asitin kalibrasyon grafiği

- Şekil 18: Tiyosiyanat yöntemi ile elde edilen sulu ekstrelerin absorbanstans-konsantrasyon grafiği
- Şekil 19: DPPH yöntemi ile elde edilen standart gallik asitin % inhisyon grafiği
- Şekil 20: Sulu ekstrelerin DPPH yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 21: EtOH'lı ekstrelerin DPPH yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 22: MetOH'lı ekstrelerin DPPH yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 23: Farklı konsantrasyonlardaki DMPD'nin kalibrasyon grafiği
- Şekil 24: DMPD yöntemi ile elde edilen standart trolox % inhibisyon grafiği
- Şekil 25: Sulu ekstrelerin DMPD yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 26: EtOH'lı ekstrelerin DMPD yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 27: MetOH'lı ekstrelerin DMPD yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 28: NBT'nin farklı konsantrasyonlarının kalibrasyon grafiği
- Şekil 29: Süperoksit yöntemi ile elde edilen standart vitamin C'nin % inhibisyon grafiği
- Şekil 30: Sulu ekstrelerin süperoksit yöntemi ile elde edilen inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 31: EtOH'lı ekstrelerin süperoksit yöntemi ile elde edilen inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 32: MetOH'lı ekstrelerin süperoksit yöntemi ile elde edilen inhibisyon-konsantrasyon grafiği
- Şekil 33: Bitkilerin sulu, etanollü ve metanollü ekstrelerinin H₂O₂ metodu ile elde edilen % inhibisyon değeri
- Şekil 34: Total antioksidan cevap metodu ile elde edilen standart troloxun kalibrasyon grafiği

Şekil 35: Farklı çözücülerdeki bitki ekstralarının total antioksidan cevap metodu ile elde edilen antioksidan içerikleri

TABLÖLAR

Tablo 1: Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

Tablo 2: Düzce ili ve çevresinde kullanılan bitkisel kaynaklı halk ilaçları

Tablo3: 1 µg/ml konsantrasyondaki sulu ekstraktlerdeki fenolik madde içeriği

RESİMLER

Resim 1: *Rubus hirtus* Waldst. & Kit.

Resim 2: *Sambucus ebulus* L.

Resim 3: *Plantago major* L. ssp. *major*

Resim 4: *Plantago lanceolata* L.

Resim 5: *Hedera helix* L.

Resim 6: *Morus alba* L.

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

BHA: Bütillenmiş hidroksianisol

BHT: Bütillenmiş hidroksitoluen

PG: Propil gallat

NBT: Nitroblue tetrazolium

NBT²⁺: Yükseltgenmiş nitroblu tetrazolium

DPPH: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil

DPPH[•]: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali

DPPH-H: İndirgenmiş 1,1-difenil 2-pikril hidrazil

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit

ABTS^{•+} : 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit radikali

Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

GAE: Galik asit ekivalent

FCR: Folin-Ciocalteu Reaktifi

PMS: Fenazin metasülfat

NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit

DMPD: N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür

DMPD^{•+} : N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür radikali

NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

Ssp. : Alt tür

1.GİRİŞ

Vücutta çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olması sebebiyle oldukça reaktif olan serbest radikallerin aşırı miktarları birçok doku, organ ve sistemlerde hasarlara neden olur.^{1,2} Serbest radikaller; membran yapılarında bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitlerini peroksidasyona uğratarak membran bütünlüğünün bozulmasına, proteinlerin denatürasyonuna, çapraz bağlarla agregasyonlarına veya parçalanmaları suretiyle aktivite kaybına, karbohidrat polimerlerinin yıkılmasına, in vivo olarak glikozaminoglikanlar ve hiyaluronik asidin depolimerizasyonuna sebep olurlar. Ayrıca DNA ile reaksiyona girerek istenmeyen mutasyonlar oluşturabilirler.³

ROT (Reaktif Oksijen Türleri) düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta bir çok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Canlı vücudunda normalde radikal savunmasını sağlayan antioksidan sistemi var olup, radikaller ve antioksidan sistemler arasında bir denge söz konusudur. Antioksidanlar, kimyasal yapısı ve fonksiyon tarzına göre enzim antioksidanları, önleyici antioksidanlar ve süpürücü veya zincir kırıcı antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler. Enzim antioksidanları olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) örnek gösterilebilir. Bu antioksidanlar ROT oluşunca onları daha az zararlı ürünlere dönüştürürler. SOD süperoksit radikalini radikal olmayan H_2O_2 'ye dönüştürür. H_2O_2 (hidrojen peroksit) yüksek derecede reaktif hidroksil radikalinin öncülüdür. Fakat H_2O_2 , CAT ve GSH-Px enzimleri tarafından zararsız hale getirilir. Bu enzimler hücre içi antioksidanlar olup, hücre dışı antioksidanlar daha çok önleyici ve süpürücü tiplerdir.⁴⁻⁶

C vitamini, E vitamini, selenyum, β -karoten, likopen, lutein ve diğer karotenoidler yardımcı antioksidanlar olarak kullanılır. Bunların

haricinde flavonoidler gibi ikincil bitki metabolitleri ve terpenoidler de yardımcı antioksidan sayılabilir. ⁷ Bu da antioksidan bileşikler içeren meyve ve sebzelerin yanı sıra geleneksel olarak tıbbi amaçla kullanılan ve şifalı bitkiler olarak bilinen bitki türlerinin insan sağlığı açısından önemini ortaya koyar.

Herhangi bir enfeksiyon ya da hücre hasarı inflamasyon sürecini başlatabilir ki, bu da makrofajlar tarafından interleokinlerin ya da tümör nekroz faktörünün salınımını uyarır. Nötrofillerin aktivasyonu aşırı miktarda süperoksit radikali salarlar ve böylece hipoklöröz anyonu, hidroksil radikali, peroksinitrit radikali gibi daha toksik reaktif türlerin yapımının başlamasına neden olurlar. Bu reaktif türler halojenasyon yoluyla ya da protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu yoluyla patojenleri öldürür. Ancak, inflamasyon sırasında bu reaktif türlerin aşırı salınımı eğer oksidan-antioksidan dengesinde oksidanlar lehine bir bozukluk ortaya çıkaracak kadar fazla olursa sağlıklı hücrelere de zarar verebilir.⁸

Bu mekanizmalara dayanarak anti-inflamatuar amaçlı kullanılan bitkilerin antioksidan aktivitesinin olabileceği düşünülerek bu çalışma tasarlanmıştır. Bitkilerin yalnız besin maddesi olarak değil, pek çok hastalığın tedavisinde de kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Bitkiler içerdikleri maddelerle insan ve hayvan sağlığı yönünden önem taşırlar.⁹ Bazı kültürlerde yüzyıllardan beri kullanılan şifalı otlar veya kombinasyonları geleneksel Türk tedavilerinde önemli bir yer tutar.¹⁰ Çalışmamızda, Düzce ve çevresinden toplanan ve anti-inflamatuar amaçlı kullanılan bazı bitki türlerinin, çeşitli metotlar kullanılarak antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

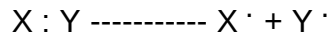
2. GENEL BİLGİLER

Anaerobik ortamlara uyum sağlamış organizmalar haricinde tüm canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene ihtiyaç duyar.¹¹ Tüm aerobik organizmaların hücresel metabolik süreçlerinde oksijenin suya indirgenmesi sırasında canlı dokularda toksik özellikte serbest radikaller ortaya çıkar.¹²

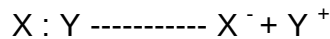
Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip reaktif atom, atom grubu moleküllerdir. Başlıcaları süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikalidir. Bu maddeler DNA, proteinler ve hücre zarlarındaki lipidler ile etkileşerek canlı dokulara zarar verirler.¹²

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir.¹³

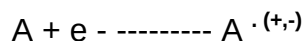
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



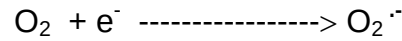
Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gereklidir. Ancak fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanır.¹⁴

Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalının hücre zarlarındaki lipid tabakalarını hasara uğratıp iyonların sızmasına sebep oldukları, ayrıca sodyum kanallarının blokajına, lipid peroksidasyonuna, bazı aminoasitlerin oksidasyonuna, polisakkaritlerin depolimerizasyonuna, membran proteinlerinin çapraz bağlanmasına ve hücre ölümüne sebep oldukları bilinir.^{15,16}

2.1. Reaktif oksijen türleri (ROT)

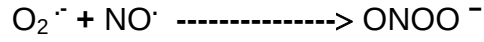
2.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü olan süperoksit radikali moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle oluşur. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.¹⁷



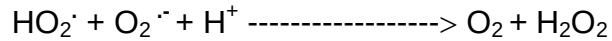
Süperoksit radikali hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla süperoksit radikallerinin birikmesine bağlıdır. Bu radikaller biriktikten sonra, bir seri zincirleme radikalik tepkimeler sonucu diğer radikaller oluşur.^{18,19}

Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.¹⁷

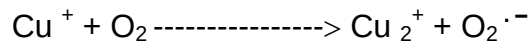
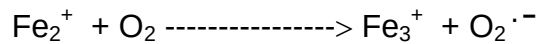


Böylece $\text{NO}^{\cdot}$ 'in normal etkisi inhibe edilir. Peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ($\text{NO}_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler. ¹⁷

Süperoksit, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali ($\text{HO}_2^{\cdot}$) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'daki protonlanmış formu %1 'den azdır. Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. ¹⁷



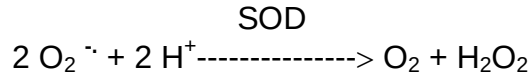
İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.



Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdürler. Bu yüzden geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir. ¹⁷

2.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Süperoksiti oluşturan her biyolojik sistem aynı zamanda kendiliğinden dismutasyon (süperoksit dismutaz enzimi vasıtası ile) reaksiyonu ile hidrojen peroksit üretir.²⁰



Hidrojen peroksitin pK'sı 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir ve perferil demir oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler.²¹

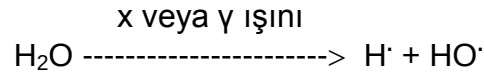
2.1.3.Hidroksil Radikali (OH·)

Biyolojik sistemlerde bilinen en reaktif tür olan OH· su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle etkileşime girebilir.²² Yarılanma ömrü çok kısadır. Bütün hücresel yapılar OH·'in bir hedefi ise de özellikle

protein, lipit ve nükleik asitler gibi elektronca zengin bileşikler tercihi hedeflerdir.^{23,24}

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali (HO[•]) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir:²⁵

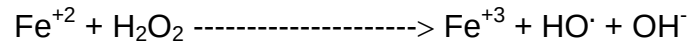
A. İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması (Homolitik yıkım) ile gerçekleşir:



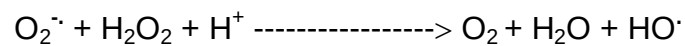
Bu tepkimeler femtosaniye içinde gerçekleşir ve üretilen hidroksil (HO[•]) radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca türdür.

B. Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile hidroksil yapımı vücutta ki bu radikalin en önemli kaynağıdır.

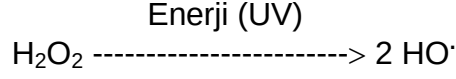
1- Fenton reaksiyonu: hidrojen peroksit Fe⁺² ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek HO[•] radikali oluşur:



2- Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit O₂^{-•} ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur.



3- H₂O₂'nin UV ışığına maruz kalması ile de HO· oluşabilir:



2.1.4. Singlet Oksijen (O₂¹)

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde yüksek enerjili elektronlarının varlığı ile reaktif oksijen türleri arasında yer alan singlet oksijen (O₂¹), serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşır.^{26,27} Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir.²⁸

Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, bu reaksiyonların başlamasına da sebep olur. Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R·), peroksil radikalleri (ROO·), alkoksil radikalleri (RO·), tiyol radikalleri (RS·) gibi önemli serbest radikaller meydana gelir.¹⁷

Doymamış yağ asitlerindeki karbon-karbon çift bağları ile doğrudan etkileşime girerek peroksil radikallerinin oluşumuna neden olan O₂¹, OH· bileşiği kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

27, 29-34

2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikal kaynaklarını endojen ve eksojen olarak iki grupta toplayabiliriz.¹⁷

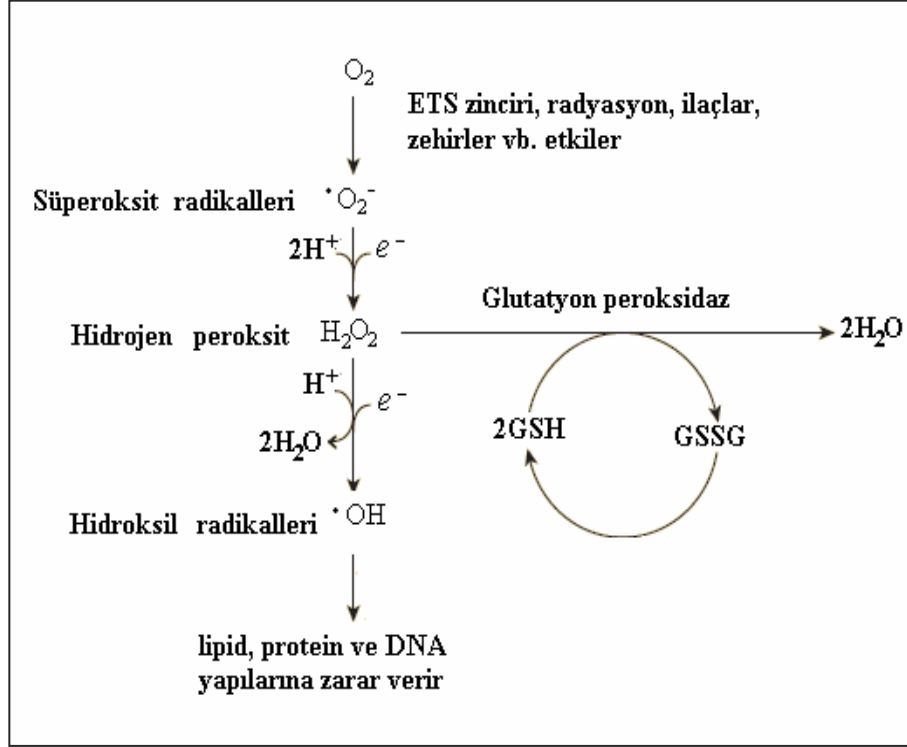
2.2.1.Endojen Kaynaklar

- ❖ Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler.
- ❖ Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin.
- ❖ Mitokondrial elektron transportu.
- ❖ Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450).
- ❖ Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler.
- ❖ Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu.
- ❖ Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon.
- ❖ Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar.

2.2.2.Eksojen kaynaklar

- ❖ Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin.
- ❖ Radyasyon.
- ❖ Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular.
- ❖ Çevresel ajanlar: (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar).
- ❖ Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu serbest radikal kaynağıdır.
- ❖ Diyet faktörleri.

Metabolizmada oluşan ve dış kaynaklı radikal ve reaktiflerin oluşum yolları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1).³⁵



Şekil 1: Serbest Radikal ve Reaktiflerin Oluşumu

2.3.Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır.¹⁷

2.3.1.Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girdiğinden DNA serbest radikallerden kolayca etkilenebilir.¹⁷ $OH^\cdot$ 'in

nükleik asitler ile tepkimeleri sonucunda ise baz modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmaları gerçekleşebilir.^{36,37} DNA yapısında meydana gelen ileri derecedeki bozukluklar onarılamadığından serbest radikaller; mutasyon, yaşlanma ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.³⁸

2.3.2. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksektir. Bu yüzden triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolay etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.¹⁷ Proteinlerin karbonil türevleri ve oksidasyon ürünleri amino asit yan zincirlerinin modifikasyonuna sebebiyet verebilir. Proteindeki karbonil guruplarının çoğalması serbest radikallerin açık hedefi olur. Peptit bağlarını koparabilir. Hücre membranındaki proteinleri yıkarak hücrenin ölümüne sebep olabilir. Enzimler de protein yapısında oldukları için fonksiyonları bozabilir.³⁹

2.3.3. Lipidler Üzerindeki Etkileri

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendine devam eden zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.¹⁷

Yağ asidinin (LH) oksidasyonu metilen karbonundan hidrojen atomunun, zincir başlatıcı radikale (R) veya hidroksil radikali gibi (OH $\cdot$) karasız yapılara transferi ile başlar ve yağ asidi radikali (L $\cdot$) oluşur. İlerleme aşamasında yağ asidi radikaline hızlı bir şekilde oksijen eklenerek peroksil radikalini (LOO $\cdot$) oluşturur. Lipid peroksil radikalleri zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır, bunlar diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatırlar. Sonlanma aşamasında lipid hidroperoksidleri yıkılarak daha reaktif radikal türleri oluşturur. Peroksi radikaller ayrıca siklik peroksidleri de oluşturabilir. Ortamda bulunan demir ve bakır tuzları lipid hidroperoksidlerinin yıkılımını hızlandırıp, oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri ile lipid peroksidasyonlarını uyarırlar.⁴⁰

Başlama: $LH + R \longrightarrow L\cdot + RH$

İlerleme: $L\cdot + O_2 \longrightarrow LOO\cdot$

$LOO\cdot + LH \longrightarrow LOOH + L\cdot$

Sonlanma: $LOOH \longrightarrow LO\cdot, LOO\cdot, \text{Malondialdehid (MDA)}$

$LOOH + Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3} + OH^- + RO\cdot$ (Alkoksi radikali)

$LOOH + Fe^{+3} \longrightarrow Fe^{+2} + H^+ + RO_2$ (Peroksi radikali)

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur.¹⁷

2.4. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için organizmalar antioksidan savunma sistemleri

geliştirmişlerdir. Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır (Tablo 1).

Tablo-1 Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	
Enzimatik Antioksidanlar		Ksantin Oksidaz İnhibitörleri	
Süperoksit dismutaz (SOD)		Tungsten	
Katalaz		Allopürinol	
Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx)		Oksipürinol	
Glutatyon redüktaz (GR)		Folik asit	
Glutatyon-S-transferaz (GST)		Pterin aldehid	
Sitokrom oksidaz		NADPH Oksidaz inhibitörleri	
Enzimatik Olmayan Antioksidanlar		Adenozin	
Melatonin	Ferritin	Lokal anestezikler	
Ürik Asit	Oksipurinol	Kalsiyum kanal blokerleri	
Albümin	Ubikinon	Non-steroid Antiinflatuar ilaçlar	
Haptoglobulin	Bilirubin	Cetiedil	
Transferin	Mannitol	Difenilen iodonium	
Laktoferrin	Lipoik asit	Trolox	
Metionin	Hemopeksin	Gıda Antioksidanları	
Miyogloblin	Sistein	Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)	
Glutatyon	Seruloplazmin	Butillenmiş hidroksianisol (BHA)	
		Propilgallat (PG)	
		Ter-bütıl hidrokinon (TBHQ)	
		Bitkisel Antioksidanlar	
		Vitamin C	Fenolik bileşikler
		Vitamin E	Vitamin A

Antioksidan Etki Tipleri

Enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler.²⁵

I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

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

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- a) Toplayıcı (scavenging) etki: Reaktif oksijen türevlerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme (Ör: Enzimler).
- b) Bastırıcı (quencher) etki: Reaktif oksijen türevleri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma (Ör: Flavonoidler, vitaminler).
- c) Onarıcı (repair) etki.
- d) Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Reaktif oksijen türevlerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller).

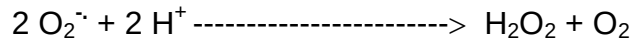
2.4.1 Endojen Antioksidanlar

2.4.1.1.Enzim Yapısındaki antioksidanlar:

Süperoksit Dismutaz (SOD)

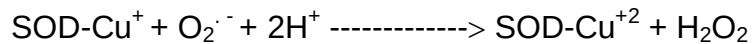
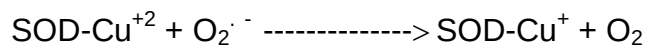
Süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.

SOD



Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'nin ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür.¹⁷

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu, Cu⁺² ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu⁺² ye transfer olurken Cu⁺ ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu⁺ dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu⁺² formuna dönmüş olur.⁴¹



SOD fagosit edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunur. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksite özgü tepkimeler görülmeye başlar.⁴²

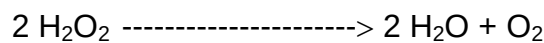
Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı oldukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar, metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit, indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri (glutatyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler.

Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini($H_2O_2^{\cdot}$) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve tokoferol gibi antioksidanları oksitleyebilir.⁴³

Katalaz

Katalaz peroksizomlarda lokalize ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır.

CAT

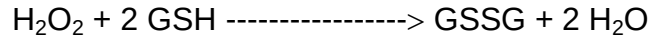


Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez.¹⁷

Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolda yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Karaciğerde en yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta düşük aktivitede bulunur.

GPx



GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H_2O_2 de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur.^{17,25}

Glutasyon Redüktaz (GR)

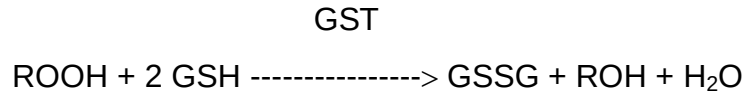
GPx tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin redüksiyonu sırasında glutatyon okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Bu okside formun ilerde kullanılmak üzere tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutatyon deposu sınırlıdır. GR, NADPH varlığında glutatyon disülfiti tekrar redükte glutatyon (GSH) çevirir:

GR



Glutasyon-S-Transferaz (GST)

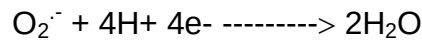
GST'lar iki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler:



Genel olarak 3 sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar.^{17,25}

Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ($\text{O}_2^{\cdot-}$) detoksifiye eder.



Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli devam eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zararlı etkilerine engel olurlar.⁴⁴

2.4.1.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Melatonin

Melatonin en zararlı radikal olan OH radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. OH[·] ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür. Bu da ortamdaki O₂⁻ radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir. Diğer antioksidanlara göre çok güçlü bir antioksidan olmasının nedenleri şöyledir: ¹⁷

1. Lipofilik olması nedeniyle hücrenin hemen tüm organellerine, birçok dokuya rahatça girerek geniş bir alanda aktivite gösterir;
2. Hücre çekirdeğine girebilmesi nedeniyle DNA'yı oksidatif hasara karşı korur;
3. Çok yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımında bile toksik bir etkisi yoktur;
4. Prooksidan aktiviteye sahip değildir.

Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından diğer antioksidanlara göre çok daha üstün bir özelliğidir.

Ferritin : Dokudaki demiri bağlar.

Albümin : LOOH ve HOCl toplayıcıdır.

Sistein : Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

Bilirubin: Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

Transferrin ve Laktoferrin : Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Ürat: Normal plazma konsantrasyonunda hidroksil, süperoksit, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Lipit radikalleri üzerinde etkisi yoktur.

Seruloplazmin: Ferro demiri (Fe^{+2}) feri demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder.

Mannitol: OH Radikalini toplayıcı etki gösterir.

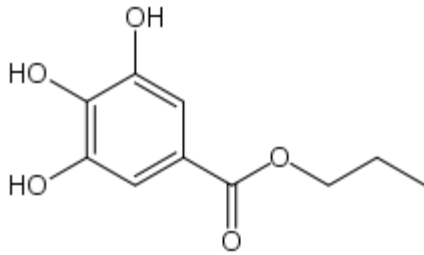
Oksipürinol: Allopürinolün metaboliti olup doğrudan $OH^\cdot$ ve $HOCl$ radikalini azaltıcı yönde etki eder.¹⁷

2.4.2. Eksojen Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütildihidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) ve troloks gibi maddelerdir.⁴⁵ Sentetik antioksidanlar gıdalarda; gıdaların oksidasyonu sonucu oluşan bozulmalar, koku oluşumu, tatların bozulması ve vitamin miktarındaki azalmalar gibi oluşan problemleri çözmede ve bunların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalardan sonra kullanımlarına ciddi sınırlama ve yasaklar getirilmiştir.⁴⁶

Propil Gallat (PG)

Gallik asitin esteri olan ve beyaz renkte katı kristaller halindeki propil gallat, hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok kullanılan sentetik antioksidandır.⁴⁷ PG demir iyonları ile birleşerek mavi-siyah kompleks oluşturduğundan, demir ve bakır katalizörleri elimine etmek için her zaman sitrik asit gibi şelatlarla kullanılır. BHA ve BHT ile sinerjik etkisi tespit edilmiştir, TBHQ ile kombinasyonu uygun görülmez. PG, bitkisel ve hayvansal yağların, taze ve donmuş et ürünlerinin ve çerezlerin oksidasyonunu inhibe etmek için kullanılır. Bundan başka PG amfifilik yapısından dolayı kuru (susuz) bitkisel yağlarda çok etkili bir antioksidandır. Gallatların uçucu özelliği BHA ve BHT'den daha düşük olduğundan, bu monohidrik fenollere oranla daha az fenolik kokuya sahiptir.⁴⁸

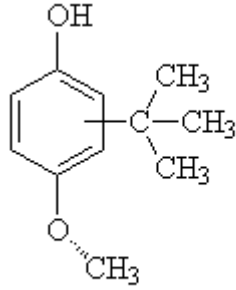


Şekil 2: 3,4,5-trihidroksipropilbenzoat

Bütil Hidroksi Anisol (BHA)

Bu antioksidan, kimyasal olarak 3-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (%90) ile 2-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (%10) izomerlerinin karışımıdır. Ticari amaçlı kullanımda beyaz mumsu tabakalar halinde bulunur. Esansiyel yağların tat ve rengini korumada kullanılır. Tahıl ve şekerleme ürünlerinde kullanılan hindistan cevizi ve palmye özü yağları gibi kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunun kontrolünde etkilidir. Bitkisel

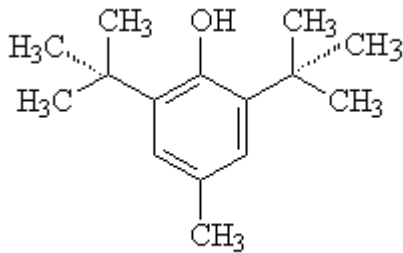
yağlardaki antioksidatif etkisi, hayvansal yağlardaki etkisine göre daha azdır.⁴⁸



Şekil 3: Bütilenmiş hidroksianisol

Bütil Hidroksi Tolüen (BHT)

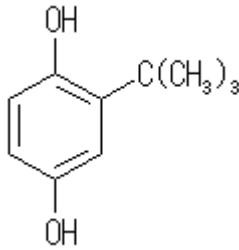
BHT (2,6-ditersiyeer bütil-4-metil fenol); beyaz renkli kristal yapıdadır. Hayvansal yağlarda oksidasyonu önleyici ajan olarak bitkisel yağlardan daha etkilidir.⁴⁹ Bu antioksidan da BHA gibi ısıya oldukça dayanıklıdır. Bu yüzden fırında pişirme ve kızartma gibi işlemlerde daha fazla ortamda kalır ve gıdaya dayanıklılık kazandırır. BHA ile sinerjistik etki gösterirken, PG ile göstermez.⁵⁰



Şekil 4: Bütilenmiş hidroksitoluen

Ter-bütilhidrokinon (TBHQ)

ter-bütilhidrokinon (TBHQ) yanan yağları oksidasyona karşı korumak için çok iyi bir antioksidan maddedir. Oksidatif stabiliteyi arttırmak için hidrojenasyona alternatif olarak gösterilir. Beyaz ile açık kahverengi arası renkte kristal yapıda olup, yağlarda yeterli miktarda çözülür, demir ve bakır gibi metallerle kompleks oluşturmaz. BHA ve BHT ile kombine olarak ya da tek başına kullanılabilir. TBHQ propil gallat'la kombine edilmez. Birçok uygulamada diğer antioksidanlara kıyasla en iyi etkiyi gösterdiği belirtilir.^{48,50,51}



Şekil 5: Tersiyerbütilhidrokinon

2.4.2.1. Bitkisel Antioksidanlar

Doğal maddelerin önemli antioksidan etki gösterdikleri ve bazen sentetik antioksidanlardan daha etkin oldukları bilinir. Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay), hayvansal ürünler (peptitler, amino asitler ve karotenoidler), enzimler (glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) ve bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynakları arasında yer alır.⁵² Bunların antioksidan aktiviteleri fenolik bileşikler, vitamin C, karotenoidler ve vitamin E gibi bileşiklerden kaynaklanır.

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar bitkilerdeki antioksidanların kardiyovasküler hastalıklar, çeşitli kanser tipleri, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile kronik, dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu ve anti inflamatuvar etkileri olduğunu göstermiştir.⁵³

Fenolik Bileşikler

Fenoller, benzen halkasına bağlı –OH grubu içeren ve bu özellikleri dolayısıyla zincir kırılması ile peroksil radikallerini temizleyici rol oynayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri için in vitro olarak kullanılan güçlü antioksidan bileşenleridir.⁵⁴

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerdir. Önemli antioksidanlar olarak serbest radikal temizleyici ve zincir kırıcı etki gösterirler. Bunun yanında flavonoidler reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu azaltırlar. Yüksek oksitlenmiş ROT flavonoidler aracılığıyla daha az etkili aroksil radikallerine indirgenir.⁵⁵

Fenolik bileşiklerden olan antosiyaninlerin antioksidan etkisi çeşitli mekanizmalarla açıklanır. Flavonoidlerin peroksil ve alkoksil radikallerini temizleme yeteneği bilinir. Buna ek olarak antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi metal iyonlarıyla şelat oluşturma ve protein bağlama özelliklerine dayandırılır.⁵⁶

Fenolik asitler bitkilerde yaygın olarak bulunan suda çözünen fenolik bileşiklerdir. Antioksidan aktivitelerini, hidrojen atomlarını vererek, hidroksil, singlet oksijen, peroksil, peroksinitrit radikallerini süpürerek veya geçiş metalleriyle şelat oluşturarak gösterir.⁵⁷

Vitamin C (Askorbik Asit)

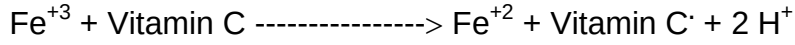
Askorbik asit; sulu ortamlarda serbest radikallerle tepkimeye girebilme yeteneğinde olan suda çözünür bir vitamin ve güçlü bir antioksidandır. Özellikle taze yeşil sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C vitamini, organizmada bir çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijen (O_2^1) ile kolayca reaksiyona girerek bunları temizleme ve ortamdaki uzaklaştırma özelliklerine sahiptir.⁵⁸⁻⁶²

Lipid oksidasyonunu farklı mekanizmalarla önler. Bu mekanizmalar serbest radikal ve oksijen yok edici olarak indirgen etkileriyle bazı okside olabilir bileşikler korumak, daha az reaktif olan semidehidroaskorbat ve dehidroaskorbik asit radikaline dönüşmek suretiyle oksijen ve karbon merkezli radikalleri indirgemek ve bazı antioksidanları rejenere etmek olmak üzere 3 grupta incelenebilir. Antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini de sağlar.⁶³

Askorbat; ROT üzerinde doğrudan etkili olabildiği gibi okside olmuş glutatyon (GSSG), tokoferoksil ya da fenoksil radikallerinin, (askorbat-glutatyon) döngüsü ile redüklenmesinde yer alarak dolaylı yoldan da antioksidan özellikler gösterir.⁶¹

Askorbik asitin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Askorbik asit, ferrik demiri ferröz demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek selüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferrik demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle etkileşmeye

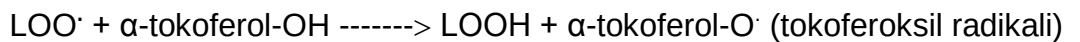
uygun olan ferröz demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur.¹⁷



Vitamin E (Tokoferol)

E vitamini tokoferol yapısında olup α , β , γ ve δ olarak dört tipin karışımıdır. α - tokoferol doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır. Antioksidan etkisi en fazla olanı da α -tokoferoldür. Tokoferoller, fenolik hidroksil gruplarından hidrojen veya elektron vererek başlangıçtaki serbest yağ asidi radikali oluşumunu engelleyerek lipid oksidasyonunu inhibe ederler. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.

En yüksek vitamin E konsantrasyonu mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olan vitamin E hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyucu savunma elemanıdır. Bir molekül vitamin E 100 molekül yağ asidinin peroksidasyonunu önleyebilir. Vitamin E, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{HO}^{\cdot}$, singlet O_2 , lipid peroksil ($\text{LOO}^{\cdot}$) radikallerini ve diğer radikalleri temizler. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir.¹⁷⁻²⁵



Vitamin A (β -Karoten)

Karotenoidler, birçok meyve ve sebzede bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renk veren pigmentlerdir. Çoklu doymamış yapıları bu pigmentlere kolay okside olabilen ve stabil olmayan bir yapı kazandırır. Karotenoidler, hidrokarbonlar (α , β , γ karoten ve likopen) ve ksantofiller (lutein ve kapsantin) olmak üzere 2 gruba ayrılır. Vitamin A metabolik ön maddesi olan β -karoten son derece güçlü singlet O_2 temizleyicisi olup ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyon verip lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir. Karotenoidler içerisinde en etkili antioksidan likopen olup, bunu sırasıyla β kriptoksantin ve β karoten izler. Ksantofiller ise minimum antioksidan aktiviteye sahiptirler. Kırmızı, sarı ve turuncu meyveler, kök bitkileri ve sebzeler en önemli karotenoid kaynaklarıdır.⁶³

A vitamini oksijen etkisi ile kolayca oksitlenir. Görme, üreme, büyüme, epitel hücre sağlamlığında rol oynar.¹⁷

2.5.Çalışılan Bitkiler

Çalışmada Düzce yöresinden yara iyileştirme amaçlı kullanılan bitkiler seçilmiştir.

2.5.1. *Rubus hirtus* Waldst. & Kit.

Yöresel adı: Böğürtlen, Tiken, Avat, Karaköstek

Botanik özelliği: Rosaceae familyasına ait çalimsı bir bitkidir. Uzun sürünücü tomurcukları; sivrilen silindir şeklinde, kahverengi, tüylü, eşit olmayan biz biçimli zayıf dikenli, salgı tüylü ve iğnelidir. Salgı tüyleri genellikle pembe-kırmızıdır. Yaprakları 3-5 parçalı, kenarları eşit olmayan dişli, iki renkli, üst ve alt tarafı kaba tüylüdür. Yandaki yaprakçıklar kısaca saplı, uçtaki yaprakçıklar 5 – 16 cm, yaprak sapının 4 – 6 (-10) katı kadar uzunlukta ovattan hemen hemen dairemsiye kadar değişen şekillerde veya hemen hemen kordat, tepede keskin, uzun sivri - dişli uçluya kadar değişen şekillerde; kulakçıklar linear, kenarları salgı tüylüdür. Bileşik salkım gevşek, hemen hemen yapraksız, ovattan pramide kadar değişen şekillerde, zik zak eksenli, 12–50 çiçeklidir. Çiçekli sürgünler çoğunlukla hemen hemen pulsu, ince, iğnemsı dikenli ve 1,5–4 mm uzunluğa kadar sık salgı tüylüdür. Çanak yaprakları belirgin olarak kuyruk şeklinde uzantılı, meyve halindeyken dik, salgı ve keçemsı tüylüdür. Taç yaprakları beyaz renkli, dikdörtgensı, ters yumurta biçimli ve 6–8(-10) mm uzunluğundadır. Meyve; eriksıdır, olgun meyve siyah, çok sayıdadır. Çiçeklenme zamanı haziran-temmuz aylarıdır. Karışık ve yaprak döken ormanlarda, deniz seviyesinden-2000 m'ye kadar yayılış gösterir. Avrupa-Sibırya elementidir.⁶⁴



Resim 1: *Rubus hirtus* Waldst. & Kit.

Bileşimi: Triterpen, fenolik asitler, flavonoidler (Rh-1 Apigenin, Rh-2 Luteolin-7-O-Glikozit, Rh-3 Kersetin).⁶⁵

Etki ve kullanımı: Yapılan çalışmalar sonucunda anti-inflamatuar ve antinosiseptif aktivitesi olduğu belirlenmiştir.⁶⁶

2.5.2. *Sambucus ebulus* L.

Yöresel adı: Yiğidin, Nivürden

Botanik özelliği: Caprifoliaceae familyasına ait bir bitkidir. Çalı, kötü kokan, tüysüz çok yıllıktır. Sürünücü toprak altı gövdesi vardır. Yaprakçıklar 3–6 çifttir. Mızrak biçimliden eliptik biçime kadar değişir. Kulakçıklar ovat, 8–30 mm'dir. Çiçekler beyaz bazen hafifçe pembemsidir. Meyve eriksidir. Küremsi, siyah ve 6 mm'dir. Çiçeklenme zamanı temmuz-

ağustos aylarıdır. Yaprak döken ormanlar, yol kenarlarında, 500–2000 m yükseklikte yayılış gösterir. Başlıca Türkiye'nin kuzeyinde, daha nadiren Türkiye'nin güneyinde, doğu ve iç Anadolu'da yayılış gösterir.⁶⁷



Resim 2: *Sambucus ebulus* L

Bileşimi: Yaprakları glikozit, sambunigrin, esans, tanen, malikasil, valerikasil, tartarikasil; rizomları ise asetikasil, malikasil, saponinler ve reçineler içerir.⁶⁸

Etki ve kullanımı: Yaprak, rizom ve meyveleri, infüzyon, toz ve sıvı ekstre halinde kullanılır. Yaprakları kabızlığı giderici ve iltihaplanmaya karşı, rizomları ise müshil olarak ve idrar söktürücü olarak kullanılır. Bitki kötü bir koku verir. Meyvelerinden koyu bir renk maddesi elde edilir ve boya sanayinde kullanılır. Yapraklarında yapılan çalışmalarda anti-inflamatuar ve yara iyileştirici aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.⁶⁹⁻⁷¹

2.5.3. *Plantago major* L. ssp. *major*

Yöresel adı: Damar otu, Katır kulağı, Siğil yaprağı

Botanik özelliği: Plantaginaceae familyasına ait bir bitkidir. Çok yıllıktır. Tabanda rozet biçiminde yapraklar bulunur. Yaprakları 5-9 damarlı, kalın, tabanda kalp şeklinde, tüysüzdür, eliptik-ovat veya yuvarlak-ovat şeklindedir. Çiçeklenme zamanı haziran-ağustos aylarıdır. Habitatı çamliklar, sulanmış alanlar, kanallar, bataklıklar, kayalık dağların yamaçları ve genellikle tuzlu bölgelerdir. Deniz seviyesinden-2200 m'ye kadar yayılış gösterir.⁷²



Resim 3: *Plantago major* L. ssp. *major*

Bileşimi: B1 vitamini, riboflavin, aukubin, askorbik asit, apigenin, baikalein, hispidulin, plantagin, benzoik asit, klorojenik asit, sitrik asit, ferulik-asit, oleanolik-asit, salisilik asit, ursolik asit, pektin, saponin, oksalik asit, müsilaj ve allantoin içerir.⁷³

Etki ve kullanımı: Biyolojik bir dizi çalışma sonucunda yaprak ve tohumları yara iyileşmesi aktivitesi de dahil olmak üzere, analjezik, antioksidan, zayıf antibiyotik, immünmodölatör, antiülserojenik, zayıf antiviral ve hepatoprotektif aktivitesi olduğu belirlenmiştir.⁷⁴⁻⁷⁷ Ayrıca antibakteriyel, panzehir, astrenjan, antiinflamatuvar, antiseptik, antitusif, kardiyak, teskin edici, idrar söktürücü, balgam söktürücü, hemostatik, müshil, oftalmik, solucan ilacı olarak, astım, amfizem, mesane problemleri, bronşit, ateş, hipertansiyon, romatizma ve kan şekeri kontrolü için alternatif ilaç olarak kullanılır.

2.5.4. *Plantago lanceolata* L.

Yöresel adı: İnce yapraklı Damar otu

Botanik özelliği: Plantaginaceae familyasına ait bir bitkidir. Çok yıllıktır. Tabanda çok sayıda rozet biçiminde yapraklar bulunur. Yapraklar mızraksı-ovate, mızraksı veya dar mızraksıdır. Yaprak kenarları düz veya düzensiz dişli, 3-5-7 damarlı, tüysüz, sapsız veya sap uzunluğu yaprak ayasının 1/3'ü kadardır. Çiçeklenme zamanı nisan-ekim aylarıdır. Deniz kıyılarında, kumlu sahillerde, çayırlarda, bataklıklarda, dere kenarlarında, koruluk alanlarda, *Pinus* ormanlarında, çöplük alanlarda, 1-3050 m yükseklik aralığında yayılış gösterir. Hemen hemen Türkiye'nin her yerinde yayılış gösterir.⁷⁸



Resim 4 : *Plantago lanceolata* L.

Bileşimi: Müsilaj, laksatif, glikozit (özellikle aukubin), tanneler, klorojenik asit, çinko, ursolik asit, plantagomajosid içerir.⁷⁹

Etki ve kullanımı: Yapılan araştırmalarda anti-inflamatuar, antimikrobiyal, nematisidal ve antipeptik ülser, antibakteriyel, antidiyareik, antiviral, immünostimülan aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.^{80,81}

2.5.5. *Hedera helix* L.

Yöresel adı: Kersen, Bezükotu

Botanik özelliği: Araliaceae familyasına ait bir bitkidir. Odunsu, çok yıllıktır; gövdesi tırmanıcı veya sürünücüdür. 30 m ye kadar büyüyebilir. Genç sürgünleri ve çiçek durumu yıldız tüylerle kaplıdır.

Yaprakları tüysüz, her daim yeşil, çiçekli sürgünlerde dar eliptik-suborbikular-kordattır. Genellikle yaprak kenarı düzdür. Petal 3-5 mm, yeşilimsi, ilk önce genişleyen daha sonra aşağıya kıvrık şekildedir. Meyve üzüm şeklindedir. Sarı veya mavi-siyahtır. Çiçeklenme zamanı haziran-ağustos aylarıdır. Habitatları ağaçların üzeri veya orman tabanıdır. Deniz seviyesinden 1500 m'ye kadar yayılış gösterirler.⁸²



Resim 5: *Hedera helix* L.

Bileşimi: Yapraklarında, triterpen-saponinler %4-5 oranında olup bunun %80'ini Hedera saponin C ve az miktarda Hedera saponin B, E, F ve G ile monodesmosidler (α -Hederin ve Hederagenin-3-O- β -D-glikozit) içerir. Hedera saponin C'nin hidroksitlenmesi ile α -Hederin'e dönüşür. Hedera Saponin B'nin hidroksitlenmesi ile Hederin β -Hederin'e dönüşür. α -Hederin ve β -Hederin'de parçalanarak Hederageninglikozit'e dönüşür. Flavonitler; rutosid (Rutin=Kuersetin-3-rhamno glikozit), kâmpferol-3-rhamno glikozit, siyanidin-3-monosid, eter yağı türevleri (Uçucu yağlar); Metiletilketon, metilizobutylketon, heksanol, furfurol, β -elemen ve germakren B en önemlileridir. Vitaminler çok az miktarda olup

vitamin E ve vitamin C ile β -karoten (vitamin Pro-A) minerallerden; İyot, çinko, bakır, mangan, arsenik, lityum, alüminyum içerir. Polyinler; Falkarinol ve didehidrofalkarinol sterol türevleri; Sitosterol, Stigmasterol, α -Spinasterol ve kolesterol içerir.⁸³

Etki ve kullanımı: Kramp çözücü, idrar söktürücü, terletici, balgam söktürücü, göğsü yumuşatıcı özelliklere sahiptir. Yaprığının ekstresinden elde edilen hap ve damlalar başta akut ve kronik bronşit, astım, nefes daralması, üşütme, boğmaca, kramplı öksürük ve balgama karşı, tentürü hipertiroidizm, guatr, astım, bronşit, öksürük, boğmaca ve sinüzite karşı kullanılır.⁸⁴

2.5.6.Morus alba L.

Yöresel adı: Ak dut

Botanik özelliği: Moraceae familyasına aittir. 15 m'ye kadar boylanabilen ağaçlardır. Sürgünleri zayıf, tüysüzdür. Yaprakları 6-10(-18) cm, ovat - geniş ovat, keskin sivri uçlu veya hafif uzun sivri uçlu, ince, yumuşak, genellikle her iki tarafı da tüysüz ancak yaprak koltuklarında öbekli tüylüdür. Yaprak tabanı yuvarlak ya da asimetric olup kalp şeklindedir. Yaprak kenarları bölünmemiş, loblu ya da oyuklu kenarlıdır. Kenarlar kör dişli veya yuvarlak dişlidir. Yaprak sapının uzunluğu 1-3,5 (-4) cm, çiçek sapının ise meyve kadardır. Meyve (bileşik) 1-2,5 cm, beyaz renklidir. Çiçeklenme zamanı mayıs, mayvelenme zamanı haziran ayıdır.



Resim 6: *Morus alba* L.

Bileşimi: Fenolik bileşikler, flavonoidler, tanen, steroller, alkaloidler ve saponinler içerir.⁸⁶

Etki ve kullanımı: Yapılan çalışmalarda yaprakları ateş düşürücü, idrar söktürücü, antioksidan, hiperlipidemik ve taze yapraklarının kanamaları durdurucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.^{87,88}

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum asetat (NH_4Ac) (Fluka), neokuproin (Aldrich), trolox (Acrôs), N,N-dimetil-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) (Fluka), demir(II)klorür (FeCl_2) (Aldrich), sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma &Aldrich), sodyum potasyum tartarat (Sigma &Aldrich), Folin Ciocalte's fenol reajan (Sigma &Aldrich), bakır(II)sülfat (CuSO_4) (Sigma &Aldrich), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) (Aldrich), potasyum peroksidisülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Fluka), hidrojen peroksit solusyonu %30 H_2O_2 (Fluka), 1,1-difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) (Aldrich), nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma &Aldrich), nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) (Sigma), fenazin metasülfat (PMS) (Sigma), trizma hidroklorik asit (Tris-HCl) (Sigma), L- Ascorbik asit (Sigma), linoleik asit (Fluka), amonyum tiyosiyonat (NH_4SCN) (Sigma &Aldrich), Tween 20 (Sigma), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck), disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Merck), % 96 etanol (% 96 EtOH) (Merck), metanol (MeOH) (Sigma &Aldrich), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck), α - tokoferol (Calbiochem), gallik asit (Merck).

3.1.2.Kullanılan Alet ve Cihazlar

T80 + UV-VIS Spektrofotometre: PG Instruments Ltd.

pH-metre: inoLab WTW

Hassas terazi: GR-200 AND. GİS. KAL. MERK.

İnkübatör: Jouan

Otomatik pipetler: Eppendorf, Hirschmann, Axygen
Microplate Reader: Versa max (tunable) Molecular Devices
Mini santrifüj: PCV-300 Grant-Bio
Ultrasonik Banyo: Bandelin (sonorex)
Çalkalayıcı: PST-60-HL plus Thermo Shaker Lab-4-You
Vorteks: Firlabo Agitateui Vibrant
Saf su cihazı: Millipore

3.1.3.Bitkisel Materyal

Bu çalışmada TÜBİTAK tarafından desteklenen ‘108T253’ numaralı ve ‘Düzce İli ve İlçeleri Halk İlaçları ‘ isimli proje kapsamında toplanan bitkilerin bir kısmı, çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Ancak toplanan bitkilerin çalışma için yeterli olmaması durumunda Haziran 2010 da yeniden arazi çalışması yapılarak örnek miktarı arttırılmıştır.

Bu araştırmada Düzce ili, ilçe ve köylerinde yara iyileştirme amaçlı kullanılan bitkiler seçilmiştir. Araştırmada kullanılan bitkilerin bilimsel ve yöresel adları, ait oldukları familyaları, tedavide kullanılan kısımları ve kullanım amaçları verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Kullanılan bitkisel kaynaklı halk ilaçları.

<u>Bilimsel Ad</u> <u>(Familya)</u>	<u>Yöresel Ad</u>	<u>Kullanılan</u> <u>Kısım</u>	<u>Kullanılış</u>
<i>Hedera helix</i> L. (Araliaceae)	Kersen Bezükotu	Yaprak	Yanıkta; yapraklar haşlanır, suyuyla yanık yer temizlenir. Yumurta akı tuzsuz yağ ile çırpılır, hazırlanan karışım yanığa sürülür, üzerine yaprak kapatılır. İyileşinceye kadar işlem tekrarlanır (yerde sürünen bitki kullanılır). Yarada; yaranın üzerine konulur.
<i>Morus alba</i> L. (Moraceae)	Dut	Yaprak	Hayvandaki yaralarda; hazırlanan dekoksasyon yaranın üzerine dökülür
<i>Plantago lanceolata</i> L. (Plantaginaceae)	İnce Yapraklı Damarotu	Yaprak	Mide ağrısında; yapraklardan hazırlanan infüzyon içilir. Çıbanlarda, yanıkta, yarada; taze yaprak çıban üzerine sarılır. Şeker hastalığı ve nefes darlığında; hazırlanan infüzyonu içilir
<i>Plantago major</i> L. subsp. <i>major</i> (Plantaginaceae)	Damarotu, Şuşek Sinsek Yaprağı Yaraotu	Yaprak	İltihaplı yara ve çıbanlarda; taze yaprak iltihabı akıtmak ve çıbanı patlatmak için üzerine konulur. Mayasıda, böbrek kanserinde, bronşitte, öksürükte, mide ülserinde ve ağrısında, kalp damar hastalığında, şeker hastalığında, asabiyette, basurda; hazırlanan infüzyon içilir.
<i>Sambucus ebulus</i> L. (Caprifoliaceae)	Yiğidin, Şahmelik	Yaprak	Arı sokmasında; yaprak haşlanıp rahatsız yerin üzerine konulur, şişi indirir. Ağrıda, kırıkta, çıkıkta, adet sancısında, eziklerde ve burkulmalarda yaralarda, sıtmada; yaprak közün üzerinde hafifçe soldurulur, bezin içine konup, rahatsız yerin üzerine sarılır.
<i>Rubus hirtus</i> Waldst & Kit. (Rosaceae)	Böğürtlen Karaköstek Tiken	Yaprak	Kesiklerde, yarada; kan dindirici olarak taze yaprak çiğnenir, yaraya sarılır. Mide ağrısında; uçlardaki taze yapraklar ve dallar ile hazırlanan infüzyon içilir.

3.2.Yöntem

3.2.1.Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması

Çalışmada kullanılan bitkiler, kullanıldıkları yöreden Haziran 2010 da toplanmış, bunlardan bir kısmı herbaryum materyali olarak kurallara uygun preslenip kurutulduktan sonra teşhis edilmiştir. Geri kalan büyük bir kısmı ise rutubetsiz bir ortamda yapılacak çalışma için kurutulmuştur. Bitkilerin teşhisleri Flora of Turkey and The East Aegean Islands'e göre yapılmıştır.^{64,67,72,78,82,85} Teşhis edilen türlerin örnekleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (AEF) ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (GÜEF) ve Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Herbaryumu (HEF)'de muhafaza edilmektedir.

3.2.2.Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Bitki yaprakları etanol ve metanolün % 50 (v/v) oranı, etilasetat ve bidistile su ile ekstrakte edilmiştir. Bunun için yaklaşık 1 g tartılan kurutulmuş örnekler önce çözücünün 15 mL'si ile 45 dakika, 5 mL daha ilave edilerek ikinci bir 45 dakika ve en son 5 mL daha çözücü ilavesi ile 15 dakika (toplam 105 dakika) ultrasonik banyoda, ağızları kapalı cam erlenler içinde ekstrakte edilmiştir. Bitki ekstraktları önce ince dokulu temiz bir bezden daha sonra süzgeç kağıdından geçirilmiştir. Çalışılan tüm bitki ekstraktları -80°C de porsiyonlanarak saklanmıştır.⁸⁹

3.3.Uygulanan Yöntemler

Yöntemler uygulanmadan önce büyük ve küçük hacimlerde ekstre hazırlamak ve bu ekstrelerin antioksidan kapasitelerine bakıp birbiriyle kıyaslamak için ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla *Malva* cinsine ait bir tür toplanmış ve toplanan bitkiler 77 g olarak 2 ye ayrılarak, biri liyofilizatörde, diğeri gölgede ve rutubetsiz bir ortamda kurutulmuştur. Liyofilizatörde kurutulan bitkiler 2 ayrı şilifli balona konarak -20 °C de 1 gece bekletilmiş, ertesi gün liyofilize edilmiştir. Daha sonra tartılarak liyofilizatörde kurutulan *Malva* sp.'nin 13,15 g, geleneksel olarak kurutulanın ise 8,8095 g geldiği görülmüştür. Buradaki amaç iki farklı kurutma metoduyla % kaç oranda su kaybı olduğunu hesaplamaktır. Geleneksel olarak kurutma metodunda %88,5 liyofilizatörde kurutmada %82,9 oranında su kaybı olmuştur. Geleneksel metotla kurutulan numunelerden 25 g ve 1 g tartılarak 2 farklı ekstre hazırlanmıştır. Liyofilizatörde kurutulan numuneden geleneksel olarak kurutulan 1 g numuneye eş değer olması için 1,49 g alınmıştır. 25 g tartılan numuneler 625 ml çözücüde ultrasonik banyoda çözülmüştür. Daha sonra ince dokulu bir bezden süzölmüş ve süzgeç kağıdından geçirilmiştir. 1 g olarak tartılan numunelere 25 ml çözücüde aynı işlem uygulanmıştır. Bu iki ayrı ekstre ile daha sonra TAC metoduyla çalışılmıştır. Sonuçların birbirine çok yakın olduğu görülmüş, düşük hacimlerde de hemen hemen aynı sonuçların çıktığı görülmüştür. Diğer metodlarda microplate reader ile çalışılabilmesi için küçük modifikasyonlar yapılmıştır.

Etil asetatlı ekstreler, artan veya azalan konsantrasyonlarda ölçülen absorbans değerleri tutarsız olduğu için ve çalışılan çoğu metotta çözeltilelerle uyumsuz olduğu için çalışmaya alınmamıştır.

3.3.1 Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenol İçeriği Tayin Yöntemi)

Bu yöntem, Singleton ve arkadaşları tarafından toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Gerçekte örneğin indirgenme kapasitesini tayin eder. Yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdik- fosfotungustik asit) eklendiğinde, Cu-protein komplekslerinin tirozin ve triptofan artıklarına bağlanması esasına dayanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür.^{90,91}

Kullanılan Çözeltiler:

1-0,1 M NaOH

2-Lowry A

3-Lowry B

4-%1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$

5-Lowry C

6-Folin reaktifi 1:3 oranında EtOH ile seyreltilir.

Yöntemin Uygulanışı:

Su, EtOH ve MetOH'da hazırlanan bitki ekstralarının 1000-500-250-100 ve 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonları çalışılmıştır. Her bir bitki ekstresinden x μl alınmıştır. Üzerine 125 μl Lowry C eklenip 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışıma 12,5 μl Folin reaktifi ilave edilip oluşan mavi rengin stabil kalması için 30 dakika beklenilmiştir. 750 nm'de

referans çözeltiye karşı absorbans değerleri kaydedilmiştir. Standart olarak gallik asitin 1000, 500, 250, 125 ve 62,50 µg konsantrasyonları kullanılmıştır.

3.3.2. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Kromojenik bir redoks reaktifi olan bis (neokuproin)-bakır(II) klorür ile hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasite kolaylıkla tayin edilebilir. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin Cu(II)-Nc bitki ekstresi ile 450nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanır.⁹²

Kullanılan Çözeltiler:

1- 10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi

2-Amonyum asetat(NH₄Ac) tamponu 1 M (pH=7)

3- $7,5 \times 10^{-3}$ M Neocuproin çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

Su, EtOH ve MetOH'da hazırlanan bitki ekstralarının 1000-250-125 ve 62,50 µg/ ml konsantrasyonları çalışılmıştır. Sırasıyla Cu(II) klorür çözeltisi, %96'lık etil alkolde hazırlanmış neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (pH=7) ilave edilmiştir. Daha sonra belirli oranlarda seyreltilmiş olan bitki ekstralarından son çözelti hacmi 205 µl olacak şekilde ilave edilip, oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta

çalkalanarak bekletilmiştir. 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart çözelti olarak 1000-500-250-125-62,50-31,25-15,62-7,81 µg/ml konsantrasyonlarındaki troloks ve vitamin C kullanılmıştır.

3.3.3. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite olarak ifade edilen TEAK/ABTS yönteminde; 2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında belirli bir süre içindeki ABTS⁺ radikal katyonunun absorbansında azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasite troloks cinsinden bulunur.^{93,94}

Kullanılan Çözeltiler:

1- ABTS radikal çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

Mavi-yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi etil alkolle 1:10 oranında seyreltilmiştir. Çözelti olarak etanol kullanıldığından su ve EtOH’da hazırlanmış olan bitki ekstraktları tercih edilmiştir. Ekstrelerin 1000-250-100-50 µg/ml konsantrasyonlarından alınan x µL üzerine 60µL ABTS⁺ çözeltisi ve (240-x) µL EtOH ilave edilip 734 nm’de kendi çözücülerini kör olarak kullanılarak 1. ve 6. dakika sonundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart olarak 1,95-62,50 µg/ml aralığında vitamin C ve 31,50-250 µg/ml aralığında gallik asit kullanılmıştır.

3.3.4. Lİpid Peroksidasyonunun İnhibisyonu (Tiyosiyanat)

Bu metoda göre linoleik asit emülsiyonu sabit sıcaklıkta (40°C) ve karanlıkta otooksidasyona bırakılır. Yağların oksidasyonu sırasında peroksitler oluşur. Tiyosiyanat metodu ortamdaki peroksitlerin miktarının UV görünür bölge spektrofotometresinde belirli bir dalga boyunda miktarının ölçümü esasına dayanır. Zamanla linoleik asit oksidasyonu sonucu peroksitlerin miktarı artar. Peroksitler, Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e oksitlerler. Meydana gelen Fe^{3+} iyonları, SCN ile kompleks teşkil eder ve kompleks 500 nm'de maksimum absorbans verir. Dolayısıyla yüksek absorbans değerleri yüksek linoleik asit oksidasyonunu gösterir.⁹⁵

Kullanılan Çözeltiler:

1. 0,05 M, pH 7,4 Fosfat Tamponu
2. 0,02 M, pH: 7 Fosfat Tamponu
3. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması
4. % 3,5 HCl çözeltisi
5. 20 M $FeCl_2$ çözeltisi
6. % 30 NH_4SCN çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

Bitki ekstralarının 3 konsantrasyonuna (1000-500-250 µg/ml) uygulamıştır. Sırasıyla deney tüpüne bitki ekstresi, linoleik asit emülsiyonu ve fosfat tamponu eklenmiştir. 24 saat 40°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu karışımdan 100 µL alınmıştır. Üzerine etanol, amonyum tiyosiyanat ve demir(II)klorür ($FeCl_2$) eklenmiştir. 500 nm' de absorbans değeri ölçülmüştür. Standart çözelti olarak gallik asitin 500-250-125-62,50-31,25-15,62 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır.

3.3.5. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinir. DPPH kararlı bir serbest radikaldır ve elektron veya hidrojen kabul eder. DPPH radikallerinin indirgenme kapasitesi antioksidanlar tarafından 517 nm deki absorbansın azalmasıyla belirlenir. DPPH radikali sulu veya etanollü çözeltilerinde kararlı serbest radikaller oluşturabilir. DPPH radikallerinin optik yoğunluklarının değişiminin ölçülmesiyle test örneklerinin serbest radikal giderme aktiviteleri değerlendirilir. Bu metod radikal olmayan formundan (DPPH-H) dolayı hidrojen bağlı antioksidanın varlığında alkol çözeltisindeki DPPH radikalının azalmasını temel alır. Bu metodla birlikte 517 nm de DPPH radikalının absorbansındaki azalmanın ölçülerek antioksidanın anti-radikal gücünün belirlenmesi mümkündür. Kararlı DPPH radikaline hidrojen verilmesiyle antioksidan tarafından DPPH radikali giderildiğinde absorbans azalır ve renk mordan sarıya döner.⁹⁶

Kullanılan Çözeltiler:

1-10⁻³ M DPPH^{•+} Çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

Bitkilerin su, EtOH ve MetOH ekstralarında 1000-500-250-125 µg/ml konsantrasyonlarının DPPH radikali süpürücü aktiviteleri ölçülmüştür. Standart olarak gallik asitin 1000-500-250-125-62,50 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu yöntemde gerekli miktarlardaki ekstralara 50 µl DPPH radikali eklenmiştir. 30 dakika karanlıkta çalkalanarak inkübe edilmiştir. 517 nm'de kontrol çözelti ile köre karşı okunmuştur.

3.3.6. DMPD Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

N,N'-dimethyl-*p*-fenilendiamin (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayininde ilk olarak FeCl₃ kullanılarak DMPD'nin kararlı ve pembe renkli bir radikal katyonu (DMPD^{•+}) oluşturulur. DMPD radikali, antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek bunlardan bir H atomu transfer eder. Böylece antioksidanlar DMPD'nin radikal etkisini giderirler. 505 nm'de absorbands veren pembe renkli bir çözelti olan DMPD radikali antioksidanlar ile tepkimesinden sonra rengi açılır. Azalan absorbands farkından antioksidan aktivite hesaplanır.⁹⁷

Kullanılan Çözeltiler:

1. 0,1 M asetat tamponu (pH 5,25)
2. 0,1 M DMPD çözeltisi
3. 0,001 M DMPD^{•+} çözeltisi
4. 0,05 M FeCl₃ çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

Standart çözelti olarak Trolox'un 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 ve 62,50 µg/ ml konsantrasyonları kullanılmıştır. DMPD radikal çözeltisinin farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır ve absorbands değerleri ölçülmüştür. Su, EtOH ve MetOH'da hazırlanan bitki ekstraktlarının 1000-250-100 µg/ ml konsantrasyonları çalışılmıştır. 280 µl DMPD^{•+} çözeltisine 20 µl ekstre eklenmiştir. 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. 517 nm'de köre karşı kontrol çözelti ile birlikte absorbands değerleri ölçülmüştür.

3.3.7. Süperoksit Radikali Giderme

Bu metotta, PMS-NADH-NBT sisteminde PMS-NADH bileşeni tarafından oksijenin parçalanmasından süperoksit anyonu açığa çıkar. Nitroblue tetrazolium indirgenmesi ile NBT^{2+} nin sarı rengi azalarak formazan mavisine dönüşür.

Kullanılan Çözeltiler:

1. 144 μM NBT
2. 677 μM NADH
3. 60 μM PMS
4. 0,1 M pH 7,4 Fosfat tamponu

Yöntemin Uygulanışı:

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının EtOH, MetOH ve sulu 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarına uygulanmıştır. 100 mM pH=7.4 fosfat tamponunda hazırlanan Nitroblue tetrazolium (NBT) (144 μM , 200 μl), 100 mM pH=7.4 fosfat tamponunda hazırlanan nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) (677 μM , 200 μl) ve 200 μl bitki ekstresi 4 dakika vortekslenmiştir. Bu karışımdan 150 μl alınmıştır, üzerine 100 mM pH=7.4 fosfat tamponunda hazırlanan ferrozin meta sülfat (PMS) (60 μM , 50 μL) ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımı 25°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Karışımın absorbansı 560 nm'de köre karşı 0-6 dakika boyunca okunmuştur. Reaksiyon karışımındaki absorbans azalması süperoksit radikali giderme aktivitesinin artmasının belirtisidir.⁹⁸ Standart çözelti olarak vitamin C'nin 1000-500-250-125-62,50-31,25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları kullanılmıştır. NBT'nin farklı konsantrasyonları da çalışılmıştır.

3.3.8. Hidrojen Peroksit

Bu yöntem, antioksidanların H_2O_2 'e elektron vererek, onu suya indirgemeleri esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

1. 0, 0,1 M pH 7,4 Fosfat tamponu
2. 43 mM H_2O_2 Çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

Yöntem, kullanılan bitki ekstraktlerinin su, EtOH ve MetOH ile hazırlanan 250 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarındaki çözeltilerine uygulanmıştır. Bitki ekstraktlarından 0.4 ml, üzerine 100 mM pH 7.4 fosfat tamponu ve 100 mM pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlanan hidrojenperoksit (H_2O_2) (43 mM, 240 μL) ilave edilmiştir. H_2O_2 ilave edilir edilmez karışımın 230 nm'deki absorbansı köre karşı okunmuştur.⁹⁹

3.3.9.Total Antioksidan Cevap (TAC)

Fe^{2+} -o-dianisidin kompleksinin standart solusyonu hidrojen peroksitin standart solusyonu ile Fenton-tipi reaksiyonla OH radikali üretir. Bu güçlü radikal renksiz o-dianisidin moleküllerini düşük pH'larda okside ederek sarı-kahve renkli dianisidil radikaline dönüştürür. Oksidasyon reaksiyonları dianisidil radikalleri arasında ilerler ve daha fazla oksidasyon reaksiyonları gelişir ve buna bağlı renk oluşumu artar. Antioksidanlar oksidasyon reaksiyonlarını ve renk oluşumunu baskılar. Bu reaksiyon spektrofotometre ile izlenebilir.¹⁰⁰

Kullanılan Çözeltiler:

R1: o-dianisidine +Fe²⁺

R2: H₂O₂ çözeltisi

Yöntemin Uygulanışı:

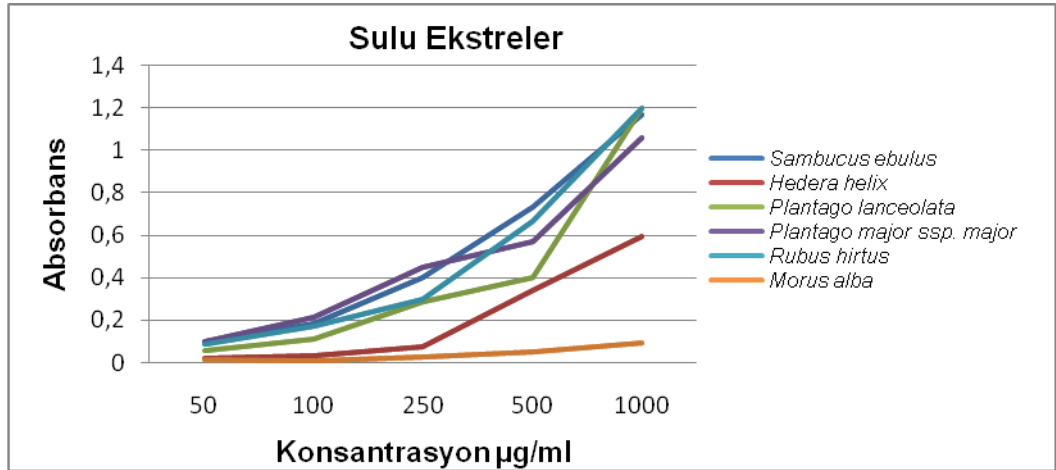
Çalışmada standart çözelti olarak (192-96-48-24-12-6-3-1,5 mg/dl) Trolox kullanılmıştır. Bitki ekstralarının EtOH, su, MetOH'deki (1 mg/ml) çözeltilerinden 5 µl alınmıştır. Üzerine 200 µl R1 eklenmiştir 4,5. dakikadan sonra 444 nm'de ilk okuma yapılmıştır. Bu karışım üzerine 10 µl R2 konulduktan sonraki her 5 dakikada maksimum absorbansı elde edene kadar absorbans değerleri kaydedilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmamızda, 6 bitki türünde total fenolik madde miktarının belirlenmesi, total antioksidan aktivite tayini, total indirgeme kapasitesinin araştırılması, DPPH[•], ABTS^{•+}, ve O₂^{•-} gibi radikallerin giderilmesi, serbest olmayan bir reaktif oksijen türü olan H₂O₂'nin giderilmesi çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar trolox, gallik asit, vitamin C, α- tokoferol gibi antioksidan ve antiradikal aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır.

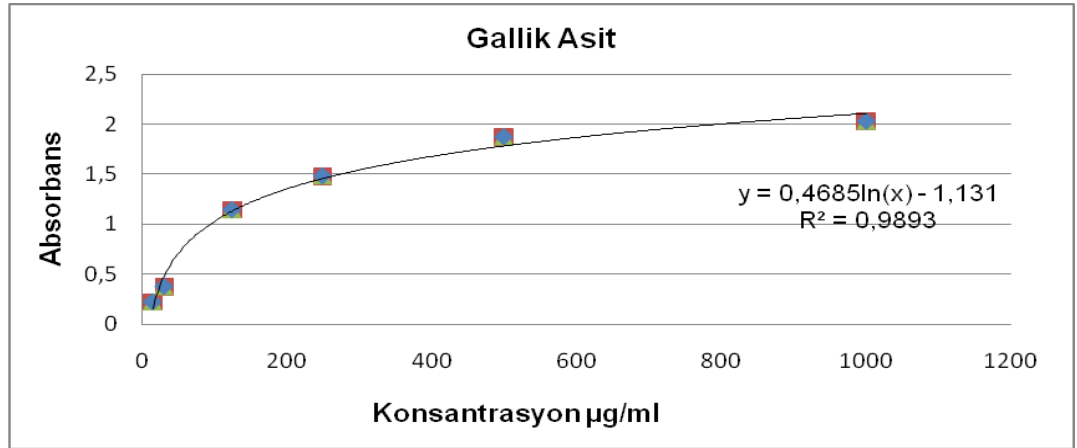
4.1. Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenol İçeriği Tayin Yöntemi)

Folin Ciocalteu yöntemi, bitkilerin su, etanol ve metanol ekstraktlarına uygulanmıştır. Alkollü ekstraktlara metot uygulandığında çökelek olduğundan sonuçlar değerlendirilmemiştir. Yöntem, sulu ekstraktların 5 farklı konsantrasyonuna (1000-500-250-100-50 µg/ml) uygulanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: Folin Metodunda sulu ekstraktların absorbans-konsantrasyon grafiği

Standart olarak 62,50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında Gallik asit kullanılmış ve bir kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Şekil 7). 1 mg/mL konsantrasyonundaki bitki ekstraktlarından elde edilen absorbans değerleri regresyon denklemine uygulanarak fenolik madde içerikleri µg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir (Tablo 3).



Şekil 7: Folin Metodunda gallik asit ile elde edilen standart kalibrasyon grafiği

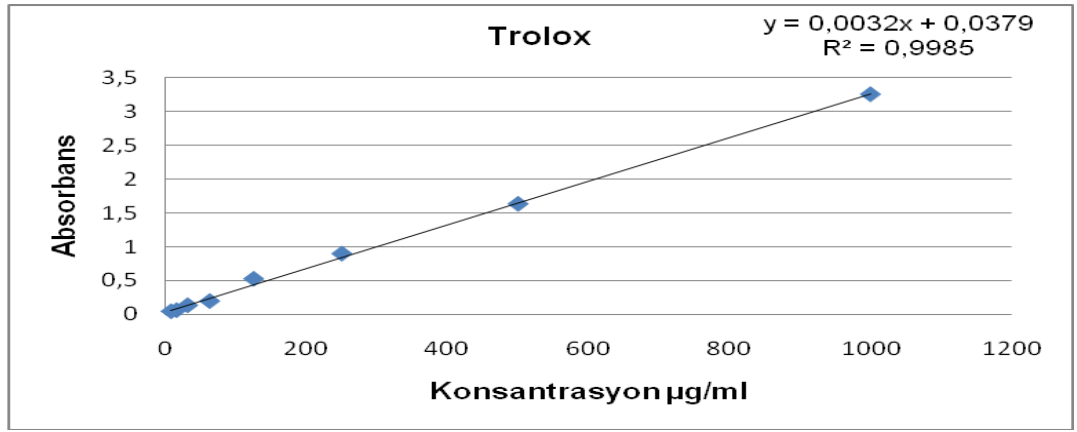
Elde edilen denklemden gallik asit eşdeğeri olarak fenolik madde içeriği hesaplanmıştır.

Tablo 3: 1 mg/mL konsantrasyondaki sulu ekstraktlerdeki fenolik madde içeriği

Sulu ekstraktler (1 mg/mL)	Fenolik madde içeriği (µg/mL)
<i>Plantago lanceolata</i> L.	146.368
<i>Rubus hirtus</i> Waldest&Kit	144.814
<i>Sambucus ebulus</i> L.	135.542
<i>Plantago major</i> L. ssp. <i>major</i>	107.407
<i>Hedera helix</i> L.	39.555
<i>Morus alba</i> L.	13.721

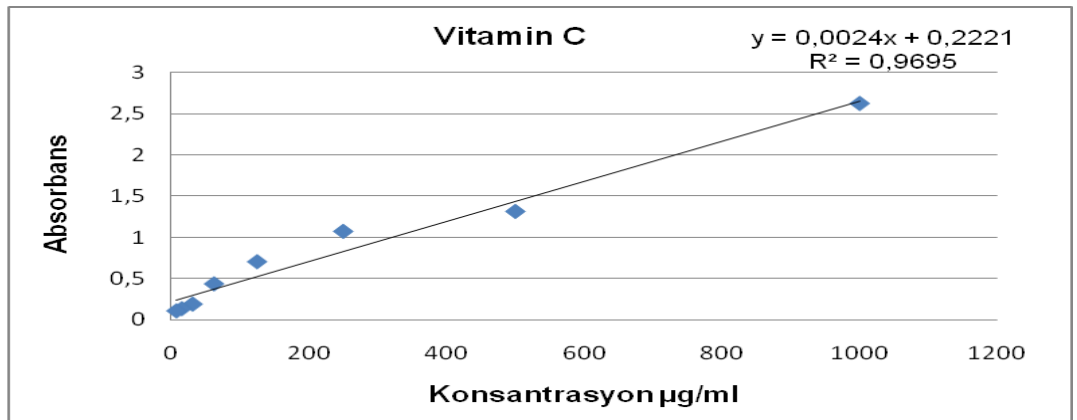
4.2.Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Cuprac yöntemi 7.81-1000 µg/ml konsantrasyon aralığındaki standart troloks çözeltilerine uygulandı. Her bir standartın 450 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı ve elde edilen değerlerden kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 8).



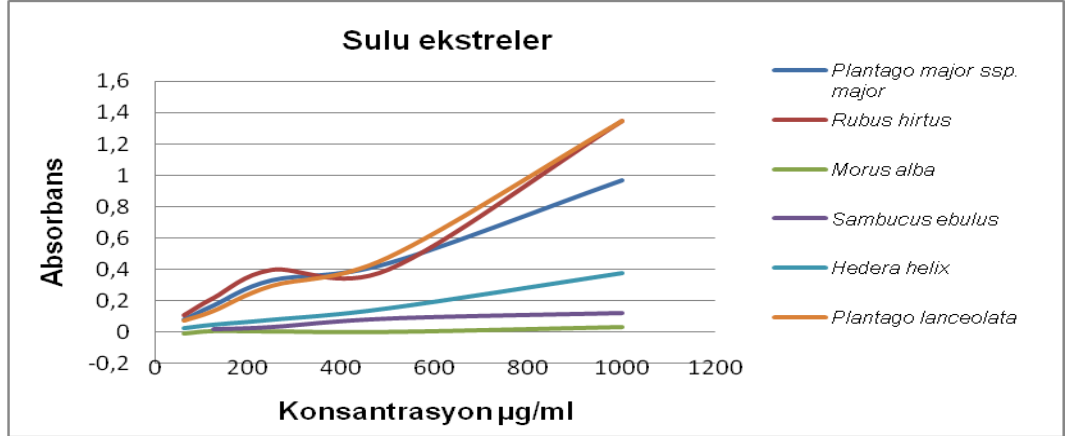
Şekil 8: Cuprac yöntemi ile elde edilen standart troloksun kalibrasyon grafiği

Cuprac yöntemi 7.81-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında standart vitamin C çözeltilerine uygulandı. Her bir standartın 450 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı ve elde edilen değerlerden kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 9).



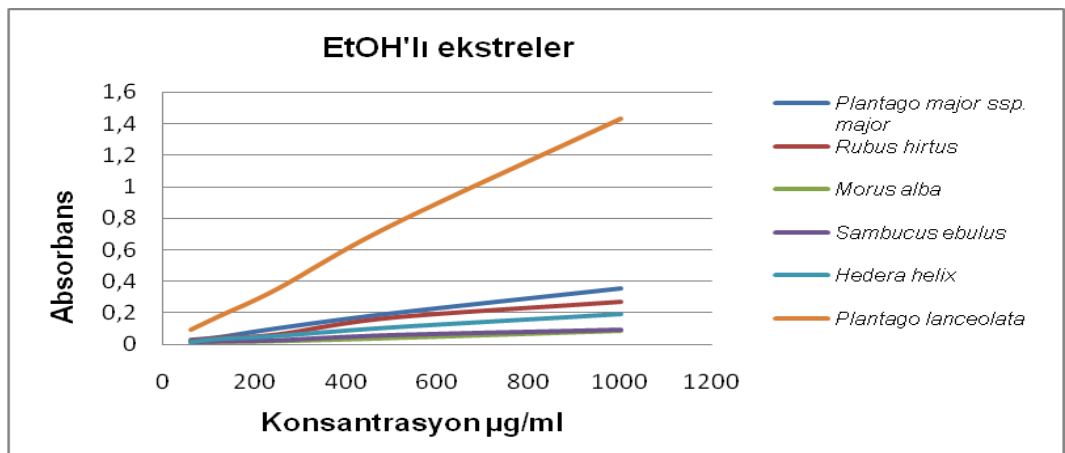
Şekil 9: Cuprac yöntemi ile elde edilen standart vitamin C'nin kalibrasyon grafiği

Yöntem sulu bitki ekstralarının 62,50-125-250-500-1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarına uygulandı. Her bir örneğin 450 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı ve elde edilen değerler grafiğe geçirildi (Şekil 10).



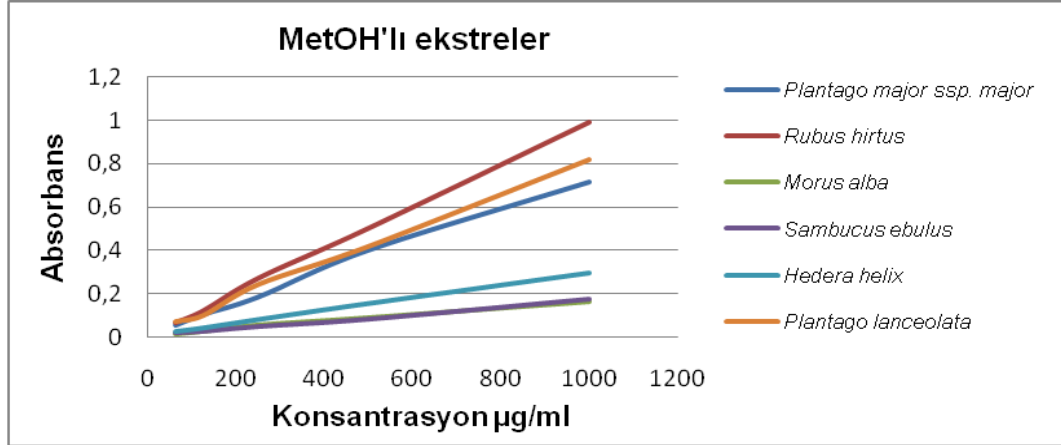
Şekil 10: Cuprac yöntemi ile elde edilen sulu ekstraların absorpsiyon-konsantrasyon grafiği

Yöntem etanolü bitki ekstralarının 62,50-125-250-500-1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarına uygulandı. Her bir örneğin 450 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı ve elde edilen değerler grafiğe geçirildi (Şekil 11).



Şekil 11: Cuprac yöntemi ile elde edilen EtOH'lu ekstraların absorpsiyon-konsantrasyon grafiği

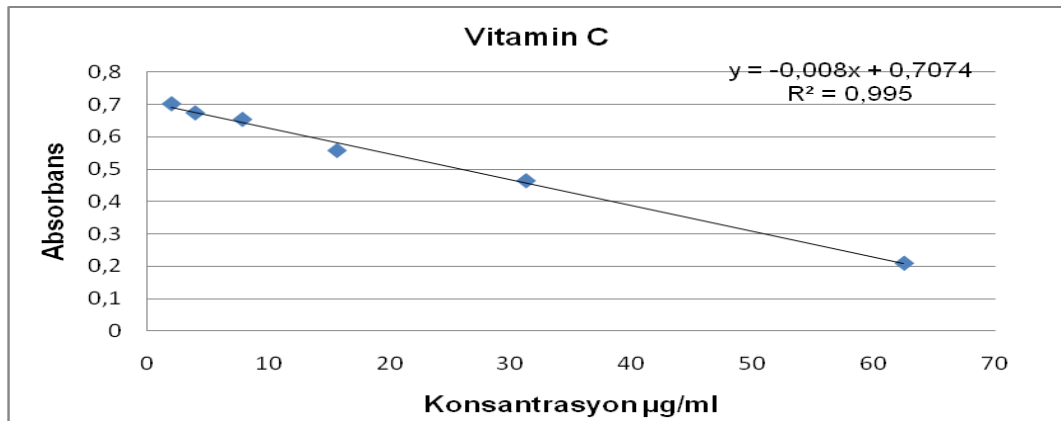
Yöntem metanollü bitki ekstralarının 62,50-125-250-500-1000 µg/ml konsantrasyonlarına uygulandı. Her bir örneğin 450 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı ve elde edilen değerler grafiğe geçirildi (Şekil 12).



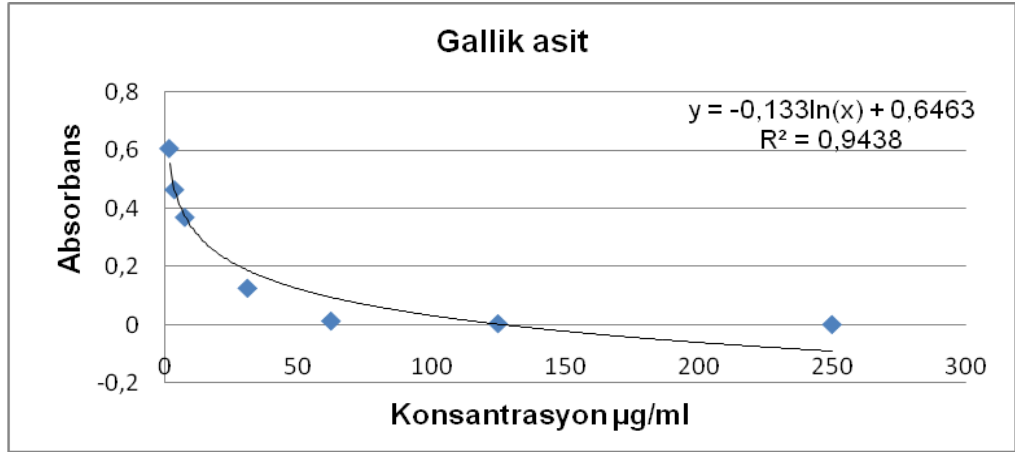
Şekil 12: Cuprac yöntemi ile elde edilen MetOH'lı ekstraların absorbens-konsantrasyon grafiği

4.3. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

ABTS yöntemi 1,95-62,50 µg/ml aralığında standart vitamin C ve 31,50-250 µg/ml aralığında gallik asite uygulandı. Maksimum absorbensin olduğu 734 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu elde edilen absorbens değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 13-Şekil 14).

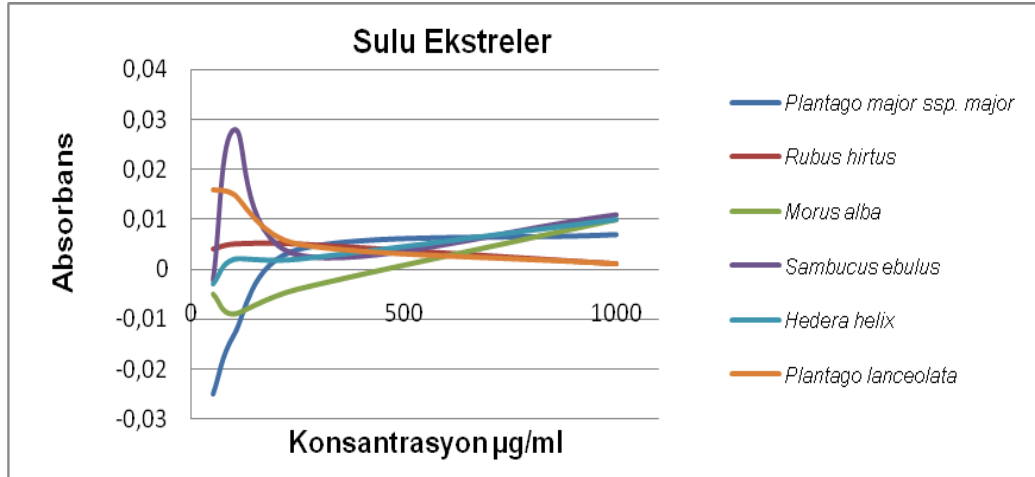


Şekil 13: ABTS yöntemi ile elde edilen standart vitamin C'nin kalibrasyon grafiği



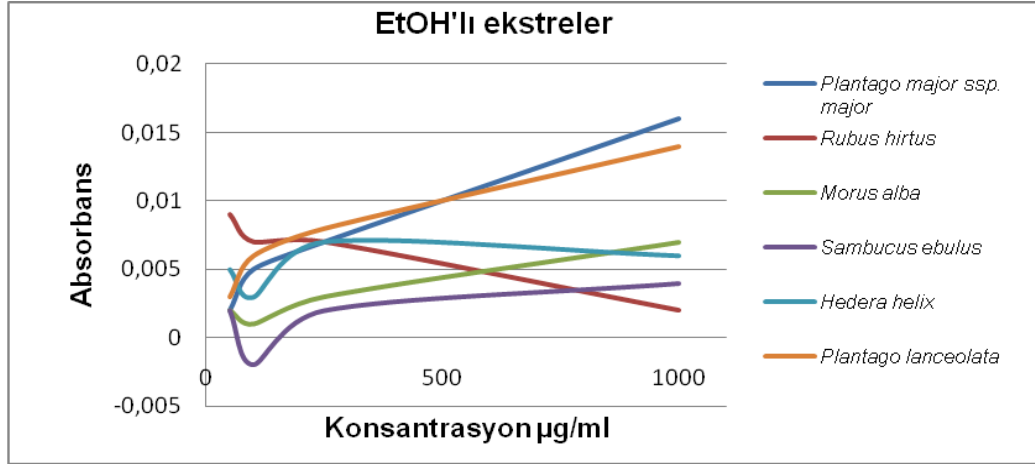
Şekil 14: ABTS yöntemi ile elde edilen standart gallik asitin kalibrasyon grafiği

Suda hazırlanmış olan bitki ekstralarının 1000-250-100-50 µg/ml konsantrasyonlarına uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 15).



Şekil 15: ABTS yöntemi ile elde edilen sulu ekstraların absorbans-konsantrasyon grafiği

EtOH'da hazırlanmış olan bitki ekstralarının 1000-250-100-50 µg/ml konsantrasyonuna uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorban değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 16).

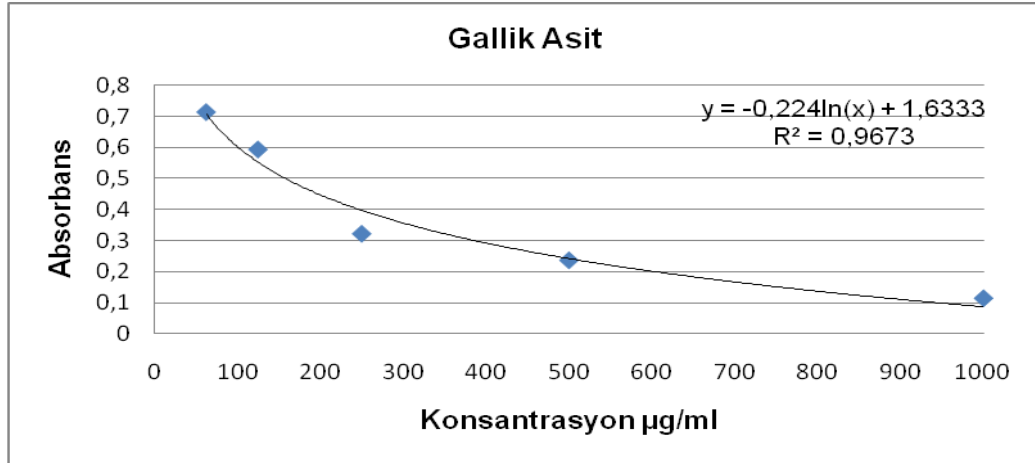


Şekil16: ABTS yöntemi ile elde edilen EtOH'lı ekstraların absorban-konsantrasyon grafiği

Bitkilerin MetOH'lı ekstraları ile yapılan ölçümlerde sonuçlar artan veya azalan konsantrasyonlarında tutarsız olduğundan çalışmaya eklenmemiştir.

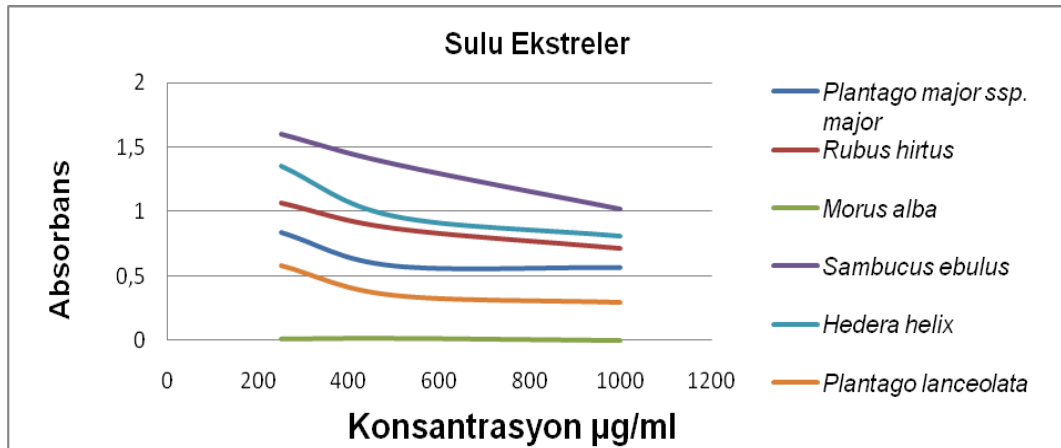
4.4. Lipid Peroksidasyonunun İnhibisyonu (Tiyosiyanat)

Tiyosiyanat yönteminde standart çözelti olarak galik asitin 1000-500-250-125-62,50-31,25-15,62 µg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Maksimum absorbanın olduğu 500nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu elde edilen absorban değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 17).



Şekil 17: Tiyosiyanat yöntemi ile elde edilen standart gallik asitin kalibrasyon grafiği

Suda hazırlanmış olan bitki ekstralarının 3 farklı konsantrasyonuna (1000-500-250 µg/ml) uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 18).

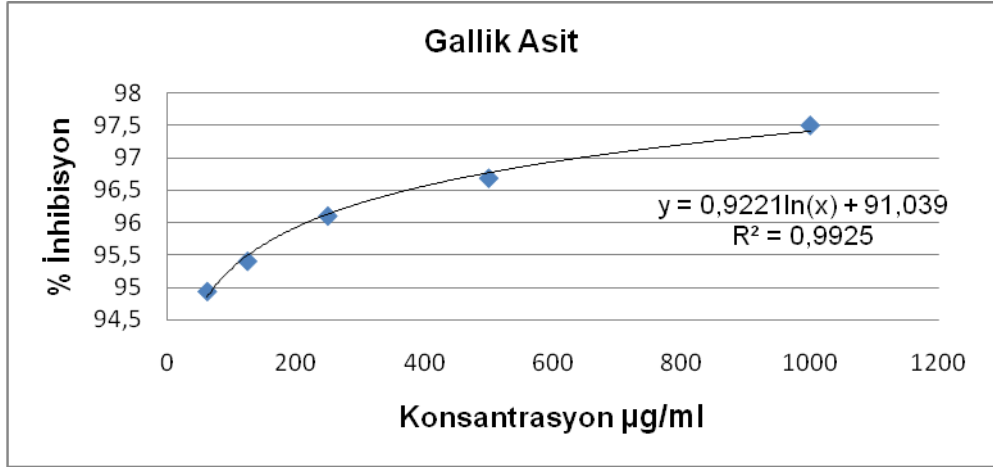


Şekil 18: Tiyosiyanat yöntemi ile elde edilen sulu ekstraların absorbans-konsantrasyon grafiği

Bitkilerin EtOH ve MetOH'lu ekstralarında kimyasal reaksiyon olmadığı için tiyosiyanat metodu bitkilerin sulu ekstralarına uygulanmıştır.

4.5. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Bitkilerin su, EtOH ve MetOH ekstrelerinde 1000-500-250-125 µg/ml konsantrasyonlarının DPPH radikali süpürücü aktiviteleri ölçülmüştür. Standart olarak gallik asitin 1000-500-250-125-62,50 µg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Maksimum absorbansın olduğu 517 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu elde edilen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi ( ekil 19).



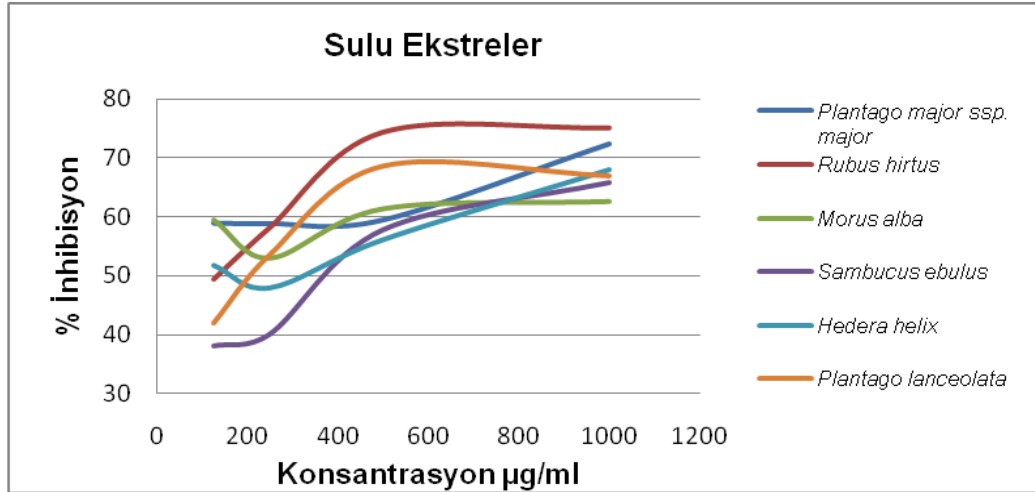
Şekil 19: DPPH  yöntemi ile elde edilen standart gallik asitin % inhibisyon grafiği

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki e itli e göre yapıldı:

$$\%inhibisyon = (A_{kontrol} - A_{numune}) / A_{kontrol} \times 100$$

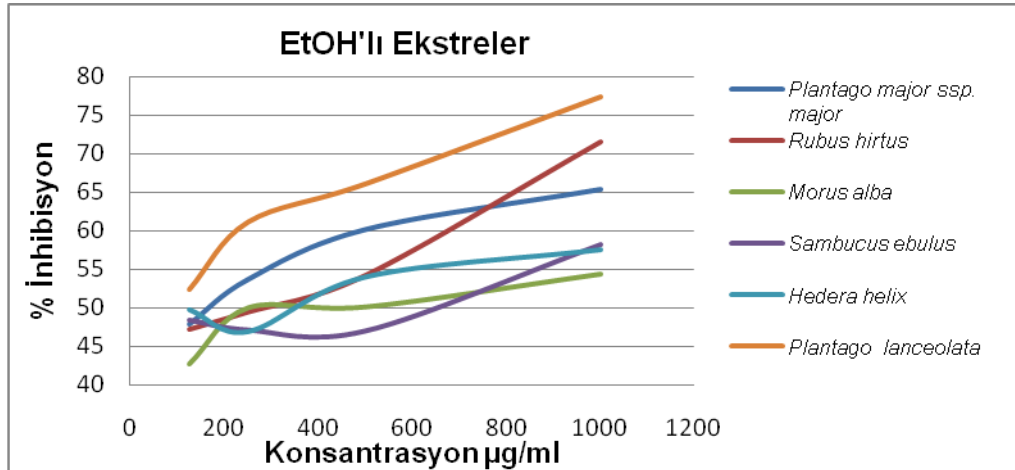
Burada A_{Numune} ; DPPH radikal   z ltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $A_{Kontrol}$ ise sadece DPPH  radikal   z ltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder.

Bitkilerin sulu ekstrelerinin 1000-500-250 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarındaki DPPH  giderme aktivitesi yüzdeleri aşağıda kar ıla tırılmalı olarak verilmiştir ( ekil 20).



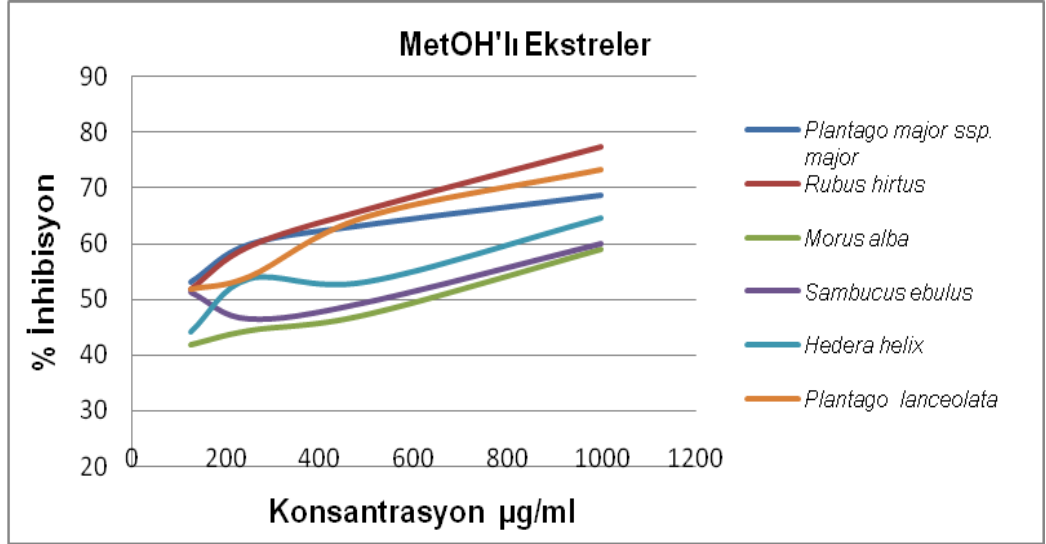
Şekil 20: Sulu ekstrelerin DPPH' yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği

Bitkilerin etanollü ekstrlerinin 1000-500-250 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarındaki DPPH• giderme aktivitesi yüzdeleri aşağıda karşılaştırılmalı olarak verilmiştir (Şekil 21).



Şekil 21: EtOH'lı ekstrelerin DPPH' yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği

Bitkilerin metanollü ekstrlerinin 1000-500-250 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarındaki DPPH• giderme aktivitesi yüzdeleri aşağıda karşılaştırılmalı olarak verilmiştir (Şekil 22).



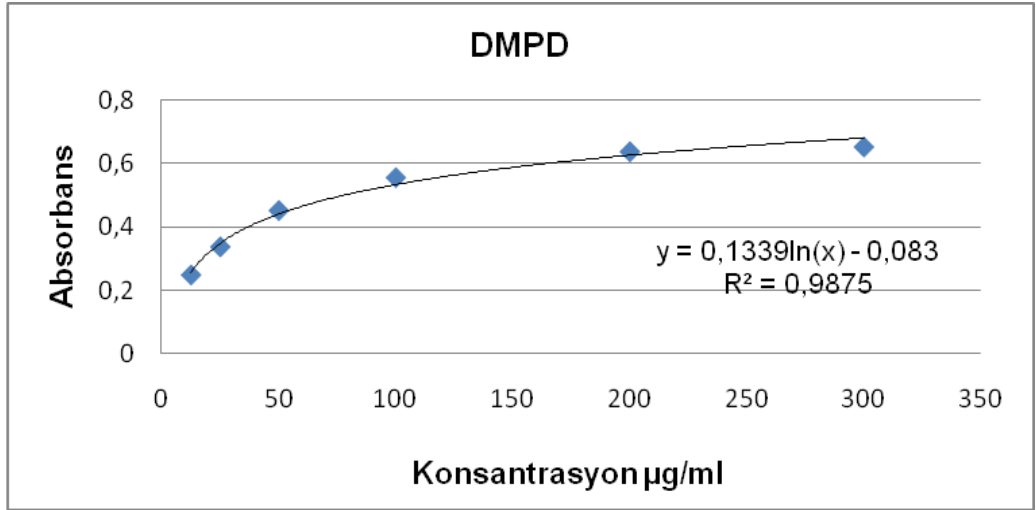
Şekil 22: MetOH'lı ekstrelerin DPPH' yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği

4.6. DMPD Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

DMPD yöntemi standart troloks çözeltisine ve bitkilerin su, etanol ve metanoldeki ekstralarının 4 ayrı konsantrasyonuna uygulanmıştır. Bitki ekstralarının % inhibisyonu şu formülle hesaplanmıştır.

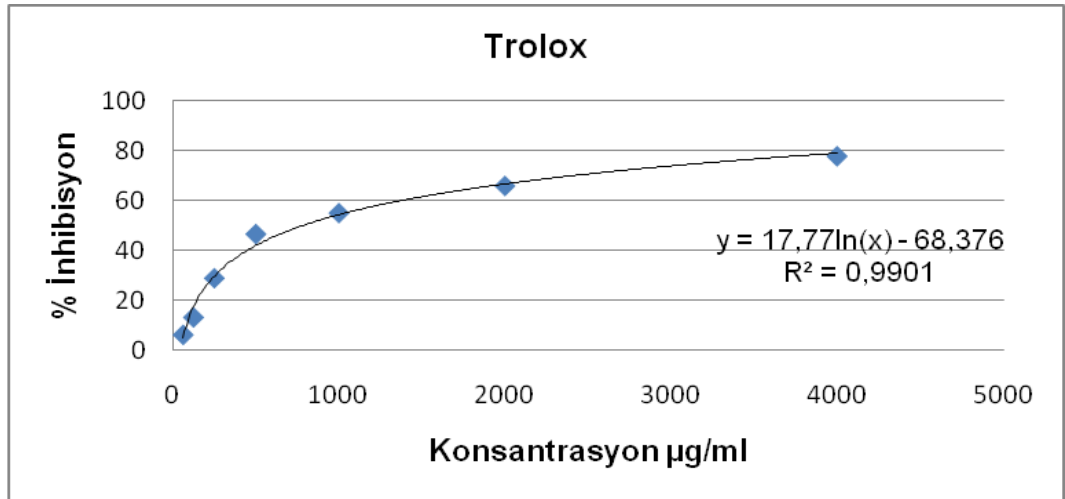
$$\%inhibisyon = (A_{kontrol} - A_{numune}) / A_{kontrol} \times 100$$

DMPD'nin farklı konsantrasyonlarının absorbans değerleri ölçülerek yöntemin doğruluğu incelenmiştir (Şekil 23).



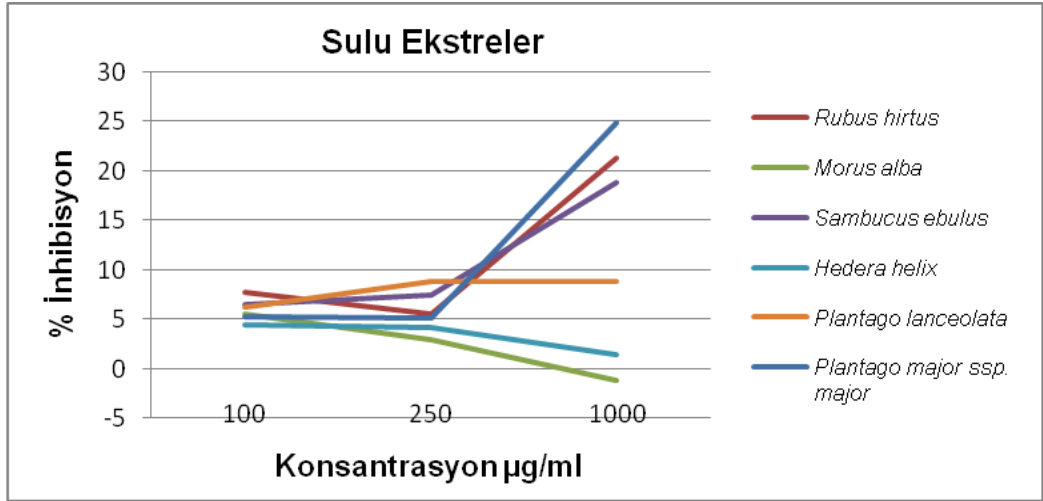
Şekil 23: Farklı konsantrasyonlardaki DMPD'nin kalibrasyon grafiği

Yedi farklı konsantrasyondaki (4000-2000-1000-500-250-125-62,50 µg/ml) troloks çözeltisinin % inhibisyon değerleri hesaplanarak grafiğe geçirildi (Şekil 24).



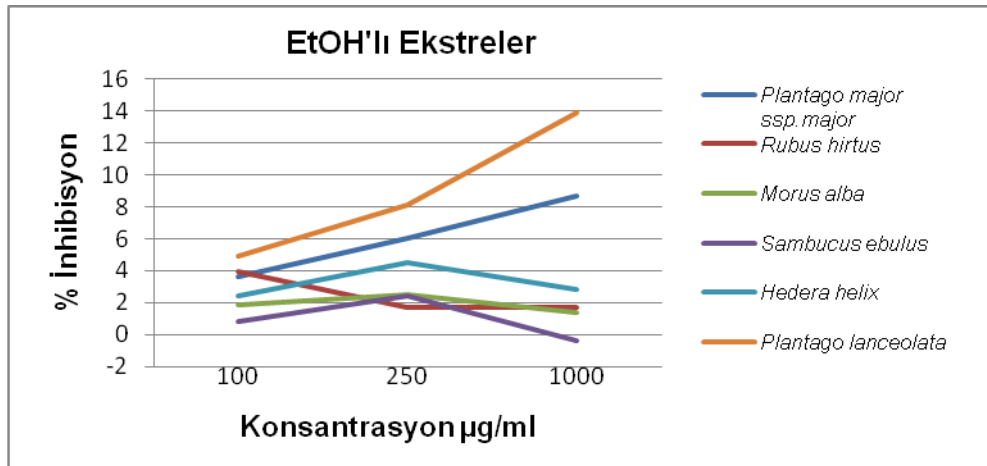
Şekil 24: DMPD yöntemi ile elde edilen standart trolox % inhibisyon grafiği

Suda hazırlanmış olan bitki ekstralarının 3 farklı konsantrasyonuna uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorbans değerleriyle hesaplanan % inhibisyonları şöyledir (Şekil 25).



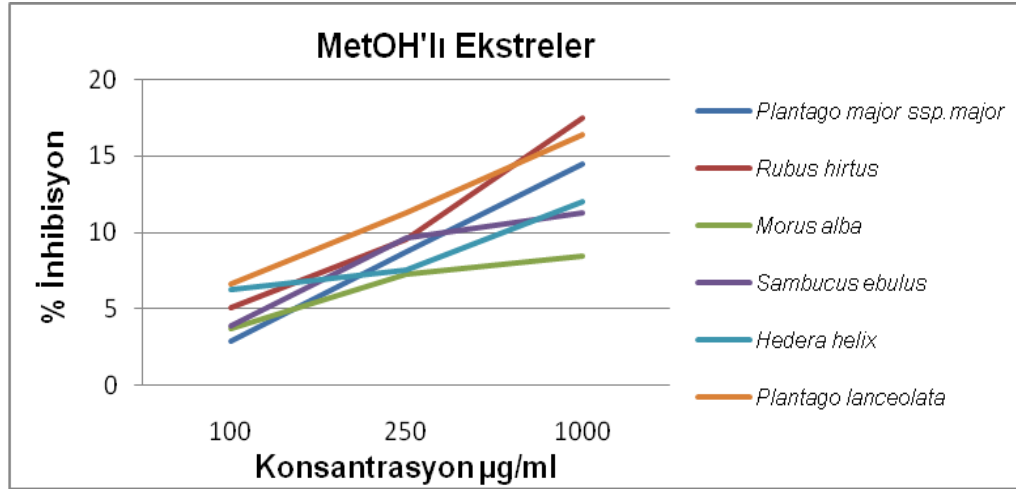
Şekil 25: Sulu ekstraktların DMPD yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği

Etanolde hazırlanmış olan bitki ekstraktlarının 3 farklı konsantrasyonuna uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorban değerleriyle hesaplanan % inhibisyonları şöyledir (Şekil 26).



Şekil 26: EtOH'lu ekstraktların DMPD yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği

Metanolde hazırlanmış olan bitki ekstraktlarının 3 farklı konsantrasyonuna uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorban değerleriyle hesaplanan % inhibisyonları şöyledir (Şekil 27).



Şekil 27: MetOH'lı ekstrelerin DMPD yöntemi ile elde edilen %inhibisyon-konsantrasyon grafiği

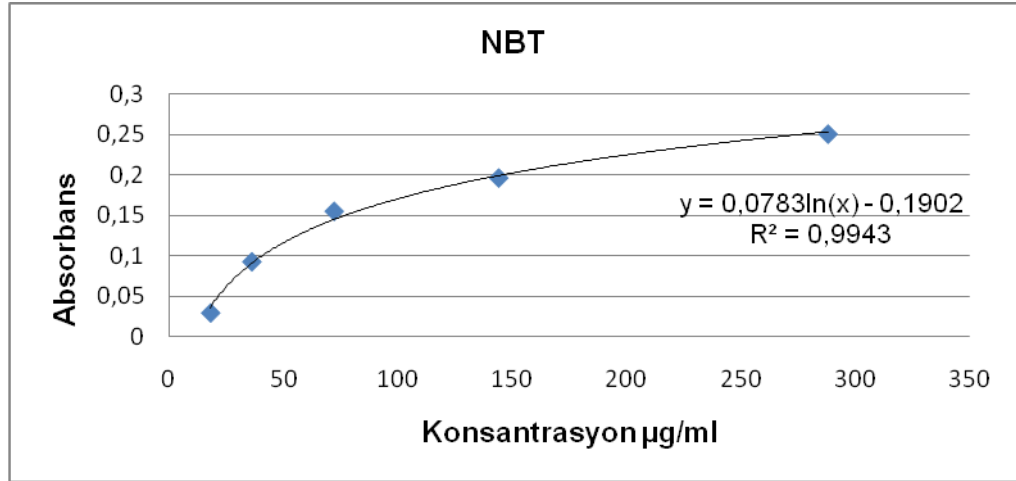
4.7. Süperoksit Radikali Giderme

Bitkilerin sulu, etanollü ve metanollü ekstrelerin 3 konsantrasyonuna uygulanmıştır. Standart çözelti olarak Vitamin C çözeltisi kullanılmıştır.

Bitki ekstrelerinin süperoksit anyonu giderme aktivitelerinin inhibisyon değerleri şu formülle hesaplandı:

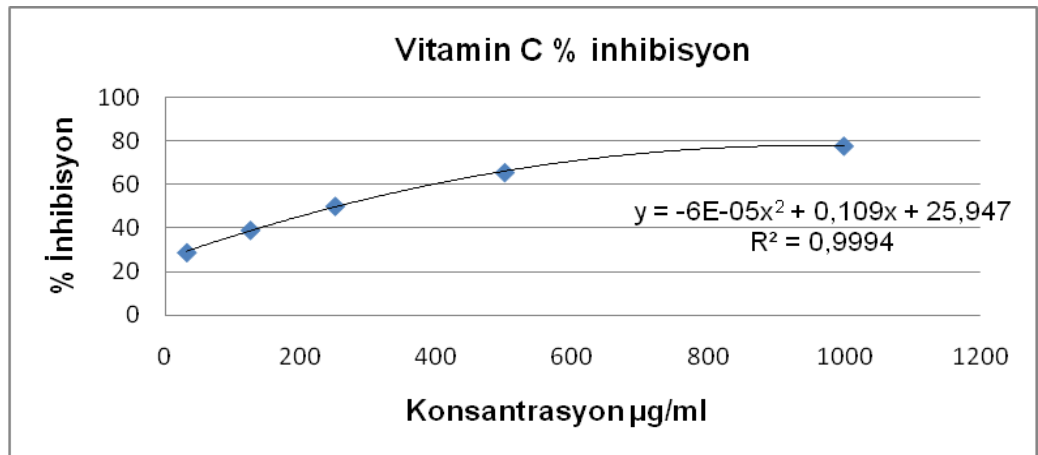
$$\% \text{inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

NBT'nin farklı konsantrasyonlarının (300-200-150-75-37,50 µg/ml) absorban değerleri ölçülerek yöntemin doğruluğu incelenmiştir (Şekil 28).



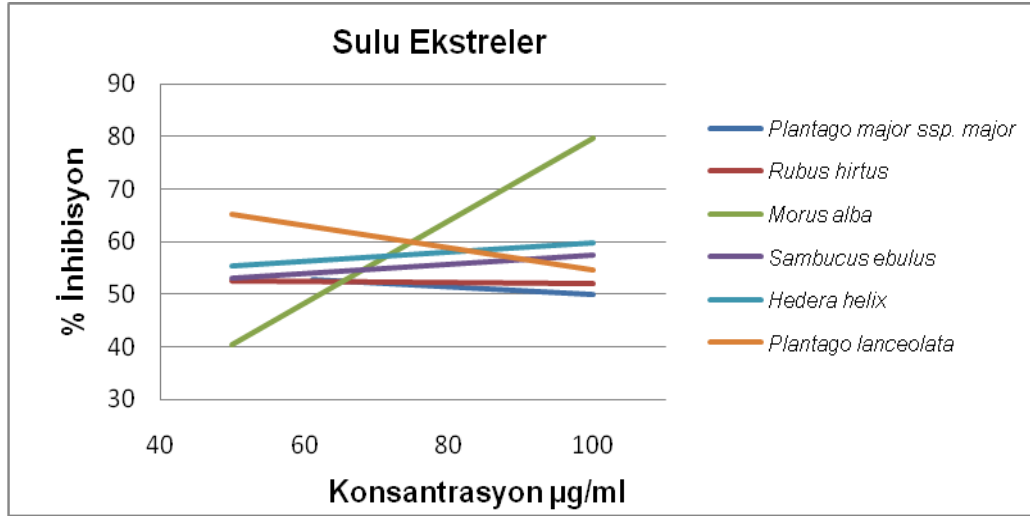
Şekil 28 : NBT'nin farklı konsantrasyonlarının kalibrasyon grafiği

Beş farklı konsantrasyondaki (1000-500-250-125-31,50 µg/ml vitamin C çözeltilisinin % inhibisyon değerleri hesaplanarak grafiğe geçirildi (Şekil 29).



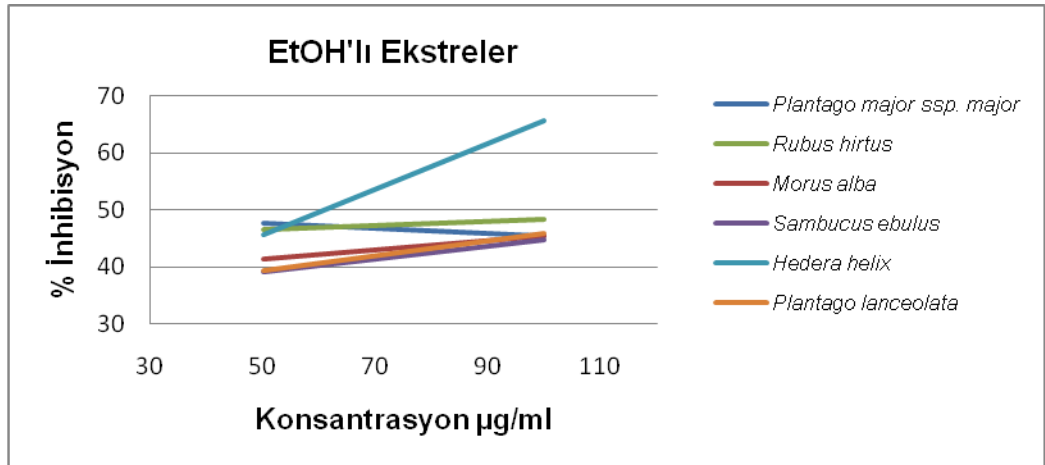
Şekil 29 : Süperoksit yöntemi ile elde edilen standart vitamin C'nin %inhibisyon grafiği

Suda hazırlanmış olan bitki ekstralarının 100-50 µg/ml konsantrasyonlarına uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorbans değerleriyle hesaplanan % inhibisyonları şöyledir (Şekil 30).



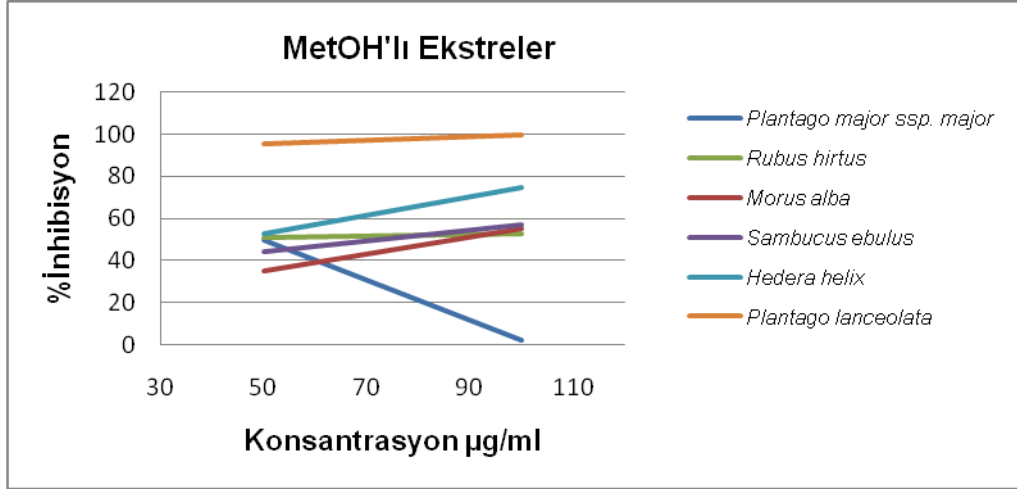
Şekil 30: Sulu ekstraktların süperoksit yöntemi ile elde edilen inhibisyon-konsantrasyon grafiği

Etanolde hazırlanmış olan bitki ekstraktlarının 100-50 µg/ml konsantrasyonlarına uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorban değerleriyle hesaplanan % inhibisyonları şöyledir (Şekil 31).



Şekil 31: EtOH'lı ekstraktların süperoksit yöntemi ile elde edilen inhibisyon-konsantrasyon grafiği

Metanolde hazırlanmış olan bitki ekstraktlarının 100-50 µg/ml konsantrasyonlarına uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorban değerleriyle hesaplanan % inhibisyonları şöyledir (Şekil 32).



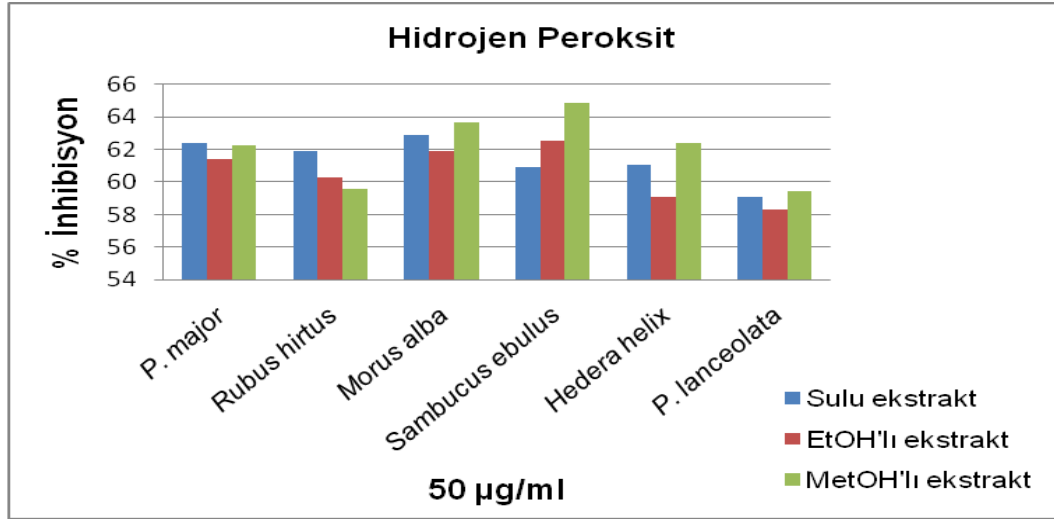
Şekil 32: MetOH'lı ekstrelerin süperoksit yöntemi ile elde edilen inhibisyon-konsantrasyon grafiği

4.8. Hidrojen Peroksitin İnhibisyonu

Hidrojen peroksiti inhibe etme değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Kontrolün absorsiyonundaki değişime göre inhibisyon değerleri belirlendi.

$$\% \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ giderme} = \frac{[\text{Kontrolün absorbansı}(230 \text{ nm}) - \text{örneğin absorbansı}(230 \text{ nm})]}{\text{Kontrolün absorbansı}(230 \text{ nm})} \times 100$$

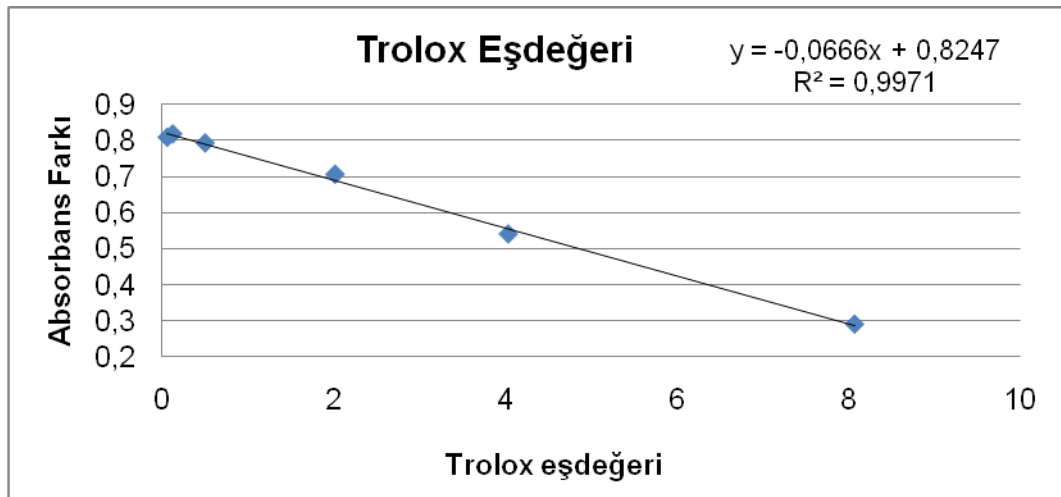
Aşağıda bitkilerin sulu, etanollü ve matanollü ekstreleri karşılaştırılarak verilmiştir (Şekil 33).



Şekil 33: Bitkilerin sulu, etanolü ve metanolü ekstrelerinin H_2O_2 metodu ile elde edilen % inhibisyon değerleri

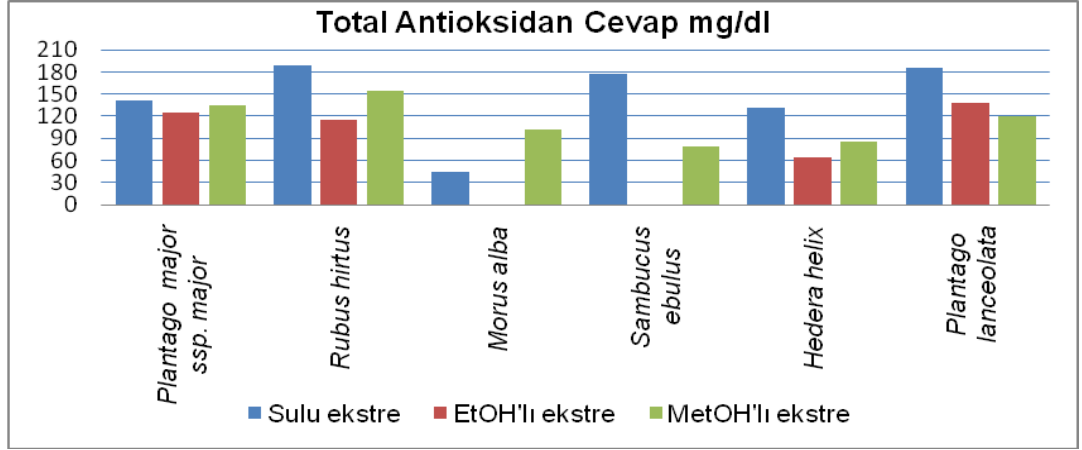
4.9.Total Antioksidan Cevap

Farklı konsantrasyonlardaki (10,9-5,45-2,73-0,68-0,17-0,09 mM) standart C vitamini çözeltisinin 444 nm de ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 34). Grafikte C vitamini eşdeğeri olarak hesaplanan Trolox eşdeğerleri kullanıldı.



Şekil 34: Total antioksidan cevap metodu ile elde edilen standart troloxun kalibrasyon grafiği

Sulu, etanollü ve metanollü bitki ekstralarının trolox eşdeğeri olarak total antioksidan kapasiteleri hesaplanmıştır (Şekil 35).



Şekil 35: Farklı çözücülerdeki bitki ekstralarının total antioksidan cevap metodu ile elde edilen antioksidan içerikleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerin karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşik bakımından zengin olmaları ve önemli yan etkilerinin halen tespit edilememesinden dolayı son yirmi yılda antioksidan aktivite sergileyen bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar halen devam eder.¹⁰¹ Antioksidan aktivite tayinleri, gıda veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik olarak aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından sıklıkla kullanılır. Bu amaçla total antioksidan aktivite tayini, total indirgeme kapasitesinin araştırılması, DPPH[•], ABTS^{•+}, ve O₂^{•-} gibi radikallerin giderilmesi, serbest olmayan bir reaktif oksijen türü olan H₂O₂'nin giderilmesi gibi metotlar sıklıkla kullanılır.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Çalışmamızda da bu metodlar kullanılmıştır. Sonuçlar troloks, gallik asit, vitamin C, α- tokoferol gibi antioksidan ve antiradikal aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda genel olarak antiinflamatuvar amaçlı kullanılan bazı bitki türlerinde antioksidan aktiviteyi inceledik. Herhangi bir enfeksiyon ya da hücre hasarı inflamasyon sürecini başlatabilir ki, bu da makrofajlar tarafından interlökinlerin ya da tumor nekroz faktörünün salınımını uyarır. Aktive olmuş nötrofiller aşırı miktarda süperoksit radikali salarlar ve böylece daha toksik reaktif türlerin yapımının başlamasına neden olurlar.

Nötrofiller ayrıca myeloperoksidaz enzimini salarlar. Bu enzim hidrojen peroksitin klorür iyonları ile reaksiyonunu katalizler ve hipoklöröz anyon oluşumuna neden olur. Ayrıca hidrojen peroksit ile hipoklöröz anyonun reaksiyonu da reaktif bir tür olan singlet oksijen oluşumuna neden olur. Süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve demir ile etkileşimi oldukça reaktif olan hidroksil radikali oluşumuna neden olurken

nitrik oksit ile reaksiyonu peroksinitrit oluşumu ile sonuçlanır. Bu reaktif türler halojenasyon yoluyla ya da protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu yoluyla patojenleri öldürür. Bununla birlikte inflamasyon sırasında bu reaktif türlerin aşırı salınımı eğer oksidan-antioksidan dengesinde bir bozukluk varsa sağlıklı hücrelere de zarar verebilir. ⁴⁶⁻⁴⁷

Mevcut çalışma, bu mekanizmalara dayanarak anti-inflamatuar olarak kullanılan bitkilerin antioksidan aktivitesinin olabileceği düşünülerek tasarlanmıştır. Düzce ve yöresinden toplanan ve anti-inflamatuar amaçlı kullanılan bazı bitki türlerinde; polifenollerin antioksidan özelliklerinin yüksek olması nedeniyle toplam fenol içeriği tayini (Folin metodu), hidrojen peroksit indirgeme kapasitesi, DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi, ABTS radikalini temizleme aktivitesi, süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitesi, DMPD radikalini giderme aktivitesi, bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi (CUPRAC metodu), lipit peroksidasyon inhibisyon kapasitesi (Tiyosiyanat metodu) ve kit yardımı ile gerçekleştirilen total antioksidan cevap tayini deneyleri uygulanmıştır.

Polifenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir. ⁴⁸ Fenoller, hidroksil grupları içermeleri nedeniyle radikal yok etme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Bu önemli bitki bileşenleri hidroksil gruplarından hidrojenlerini radikallere vererek kararlı fenoksil radikalleri oluştururlar ve antioksidan aktivitede önemli rol oynarlar. Bu yüzden bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin tayininde fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Bitkilerin sulu ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarları FCR reaktifi kullanılarak, gallik asite eşdeğer olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, ekstraktların en yüksekten en düşüğe doğru fenolik madde içeriği *Plantago lanceolata*- *Rubus hirtus*- *Sambucus ebulus*-*Plantago major* ssp. *major*-*Hedera helix*- *Morus alba* şeklindedir.

CUPRAC metodu oksidan olarak bakır (II) kullanan total antioksidan aktivite tayin yöntemidir. Bu yöntemde örnekte bulunan antioksidanlar (redüktan) tarafından Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi temel alınmıştır. Metod, ekstrelerdeki hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasitesini ölçmektedir. Yapılan standart çalışmalar ilk denemede oldukça iyi sonuçlar vermiş ve ekstrelerden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre sulu, metanollü ve etanollü ekstrelerden en yüksek aktiviteyi *Rubus hirtus* ve *Plantago* türleri gösterirken, *Hedera helix*, *Sambucus ebulus* ve *Morus alba* düşük aktivite göstermişlerdir.

Antioksidan kapasite belirlenmesinde hassas olmasının yanı sıra çabuk reaksiyon veren bir metot olan ABTS metodu da kullanılmıştır. ABTS radikal katyonunun oldukça kararsız bir yapı olması nedeniyle, deneysel sonuçlarda pek iyi sonuçlar elde edilememiştir. Nitekim, deney sonucunda sulu ekstrelerde *Rubus hirtus* ve *Plantago lanceolata*'da azalan absorbans değerleri elde edilirken, etanollü ekstrelerde yalnızca *Rubus hirtus*'un absorbansında azalma gözlenmiştir.

Çalışmamızda yağların oksidasyonu sırasında oluşan peroksitlerin Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e oksitlemesi ve meydana gelen Fe^{3+} iyonlarının SCN ile kompleks oluşturması esasına dayanan ferrik tiyosiyanat metoduyla bitkilerin sulu ekstrelerinde total antioksidan kapasite incelenmiştir. Buna göre absorbanstaki azalmanın antioksidan aktivitedeki artışı gösterdiği düşünüldüğünde, *Morus alba* herhangi bir reaksiyon vermezken, diğer tüm bitkilerin aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

DPPH serbest radikal bağlama metodu, lipid oksidasyonunu önleyen antioksidanlar için genel olarak kabul edilmiş bir mekanizmadır. Diğer metotlarla karşılaştırıldığında; DPPH serbest radikal bağlama metodu, antioksidan aktivitelerin kısmi olarak kısa zamanda belirlenmesini sağlamaktadır. Antioksidanların DPPH serbest radikalini bağlama

etkilerinin, bunların hidrojen (H) iyonu verme yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.⁵² Çalışmamızda DPPH radikali temizleme özelliği en yüksek olan bitki türü *Rubus hirtus* ve *Plantago* türleri olarak gözlenmiştir. Nispetenn en düşük etkili bileşikler ise *Morus alba* ve *Sambucus ebulus* olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar CUPRAC metodundakilerle oldukça benzerdir.

DMPD metodu, hidrofilik grupların antioksidan aktivitesinin hızlı ve duyarlı bir şekilde belirlenmesi için uygun bir yöntemdir.⁵¹ Çalışmamızda en yüksek DMPD radikali temizleme aktivitesini, sulu ekstrelerde *Plantago major* ve *Rubus hirtus* gösterirken, etanollü ekstrelerde *Plantago* türleri, metanollü ekstrelerde *Rubus hirtus* ve *Plantago* türleri göstermiştir.

Süperoksit anyon radikalının hem lipid peroksidasyonuna neden olması hem de hidroksil radikali gibi daha güçlü radikal bileşiklerinin oluşmasına sebep olması nedeniyle, ortamdan hızla temizlenmesi gerekmektedir. Askorbik asit iyi bir süperoksit radikali temizleyicisi olması nedeniyle, PMS-NADH-NBT sisteminde oluşturulan bu radikalın temizlenmesi deneyinde, standart olarak kullanılmıştır. C vitamini ile yapılan standart çalışmada oldukça iyi bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bununla birlikte, bitki ekstrelerinden elde edilen sonuçların birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Buna göre sulu ekstrelerde *Morus alba* ve *Hedera helix* en yüksek aktiviteyi gösterirken, *Plantago major* en düşük aktivite göstermiştir. Benzer şekilde etanollü ve metanollü ekstrelerde *Hedera helix* en yüksek aktiviteyi gösterirken, yine *Plantago major* en düşük aktivite göstermiştir. Süperoksit deneyinde *Hedera helix*'in her 3 ekstrede de yüksek aktivite göstermesi, bu bitkinin süperoksit radikali temizleme kapasitesinin diğerlerine göre daha iyi olduğunu gösterir.

Bir radikal olmayan ancak radikalik bir moleküle dönüşebilme kapasitesinden dolayı reaktif bir bileşik olan hidrojen peroksitin temizlenme kapasitesi incelendiğinde diğer tüm antioksidan çalışmalarında nispeten düşük kapasiteye sahip olan *Sambucus ebulus*'un etanol ve metanollü ekstraktları en yüksek inhibisyon değerleri vermiştir. *Plantago lanceolata* ise genel olarak en düşük inhibisyon değerlerine sahiptir. Sulu ekstraktlarda ise, en yüksek aktiviteyi *Morus alba* gösterirken, en düşükü *Plantago lanceolata* göstermiştir. Yöntemin bir çok deneme yapılmasına rağmen stabil sonuçlar vermemesi, elde edilen bulguların güvenilirliğini azaltmıştır. Nitekim elde edilen sonuçlar diğer yöntemlerden elde edilen sonuçlardan oldukça farklı bulunmuştur.

Kit ile yaptığımız tek deney olan total antioksidan cevap metodunda, reaksiyon ortamında hidroksil radikali gibi güçlü serbest radikaller oluşturulur ve bunlar renksiz o-dianisidine moleküllerini parlak kahverengi-sarı dianisidillere okside ederler. Ekstrelerde mevcut olan antioksidanların, oluşan bu parlak kahverengi-sarı rengi azaltması metodun temelidir.⁵¹ Örneklerin troloks eşdeğeri olarak total antioksidan kapasitelerini incelediğimizde, sulu ekstraktlarda *Rubus hirtus* ve *Plantago lanceolata* en yüksek aktiviteye sahipken *Morus alba* en düşük aktivite göstermiştir. Etanollü ekstraktlarda en yüksek aktiviteyi *Plantago* türleri gösterirken, *Sambucus ebulus* ve *Morus alba* herhangi bir aktivite göstermemiştir. Metanollü ekstraktlarda ise en yüksek aktivite *Rubus hirtus*'a aitken en düşük aktivite *Hedera helix* ve *Sambucus ebulus*'a aittir. Etanollü ekstraktlarda *Sambucus ebulus* ve *Morus alba*'nın sonuç vermemesinin kit miktarının yetersiz olması nedeniyle kaynaklandığı düşünülmektedir ve deneyler bu nedenle tekrarlanamamıştır. TAC yöntemi ile elde edilen sonuçlar diğer deneylerle tutarlıdır.

Çalışmamızda ele aldığımız bitki türleri, halk arasında genel olarak antiinflamatuvar ve yara temizleyici amaçla kullanılmaktadır. İnflamatuvar cevapla-serbest radikal reaksiyonların gelişmesi arasındaki ilişkinin tamamen ortaya çıkarılmış olması nedeniyle, bu bitki türlerinde antioksidan aktivite tayini yapmayı amaçladık. Çalışmada yer alan bitkilerin genel olarak yaprak kısımlarının tedavi amaçla kullanılması nedeniyle, toplanan yaprak örneklerinden elde edilen ekstratlarla çalışmalar yapılmıştır.

Dünya üzerinde 275 türü bulunan *Plantago* cinsinin, çok eski zamanlardan beri tıbbi amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Astrenjen, antimikrobiyal, ekspektoran, diüretik gibi birçok amaçla kullanılan bu bitki türlerinde son yıllarda antioksidan çalışmalar da sıkça yapılmaktadır. Bu çalışmalar *Plantago* türlerinin oldukça yüksek fenolik içeriğe ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.¹⁰⁵⁻¹¹⁴ Çalışmamızda da *Plantago major* ve *Plantago lanceolata*'nın yüksek fenolik madde içeriğine ve pek çok yöntemde yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Değişik *Rubus* türlerinde (*Rubus urticifolius* Poir., *Rubus parviflorus* Nutt.) yapılan antioksidan çalışmalarında, yüksek antioksidan aktivite elde edilmiştir.¹¹⁵⁻¹¹⁹ *Rubus hirtus*'un antiinflamatuvar ve antinosiseptif etkilerinin gösterilmesine rağmen¹²⁰ antioksidan aktivitesini gösteren çalışma bulunamamıştır. Çalışmamızda denenen metodların çoğunda *Rubus hirtus*'un yüksek aktivite göstermesi antiinflamatuvar özelliklerinin antioksidan etki ile ilişkilendirilebileceğini açıklamaya katkıda bulunabilir.

Sambucus ebulus'un yapılan çalışmalarda, genel olarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve bunun yüksek fenolik içeriği ile korele olduğu gösterilmiştir.¹²¹⁻¹²³ Çalışmamızda, *Sambucus ebulus*'un

total fenol içeriği *Plantago lanceolata* ve *Rubus hirtus*'a yakın bulunmasına rağmen antioksidan özellikleri aynı derecede yüksek bulunmamıştır. Bununla birlikte tiyosiyanat deneyinde en yüksek aktiviteye sahip olması, lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Hedera helix'in yapısında bulunan α -hederin ve hedera saponin C'nin güçlü bir total antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹²⁴⁻¹²⁷ Çalışmamızda *Hedera helix*'in yüksek bir lipid peroksidasyonu inhibisyon etkisi göstermesine rağmen, genel olarak antioksidan aktivitesi yüksek bulunmamıştır.

Morus alba yapraklarından¹²⁸⁻¹³⁰, meyvesinden¹³¹⁻¹³³ ve kök kabuğundan¹³⁴⁻¹³⁶ elde edilen ekstrelerle yapılan çalışmalarda yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunun gösterilmesine rağmen, çalışmamızda *Morus alba* ekstrelerinin genellikle düşük antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bunun çalışma materyalinin toplandığı bölgenin ve zamanın farklı olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızın amacı antiinflatuar etkisi nedeniyle seçilen bazı bitki türlerinin antioksidan özelliklerini incelemeye yönelik olup, elde edilen sonuçlar daha ileri çalışmalar yapılması için yönlendirici olabilir. Çalışmamızda daha yüksek fenolik içeriğe sahip olan bitki türlerinin yüksek antioksidan aktivite göstermesi, birçok çalışmada gösterilen fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi ile tutarlı bulunmuştur. Literatürlerde antiinflatuar etkisi gösterilmiş ve halk arasında da bu amaçla kullanılan bitki türlerinde farklı antioksidan aktivitelerin gözlenmesi değişik şekillerde yorumlanabilir. Bu bitkilerin antiinflatuar olarak kullanılmalarının yanı sıra başka amaçlar içinde kullanılmaları nedeniyle, asıl etkilerinin hangisi olduğunun bilinmesi yorum yapmayı kolaylaştırabilirdi. Örneğin, *Sambucus ebulus* antiinflatuar olarak

kullanımının yanında esas olarak ağrı kesici amaçla kullanılmaktadır ve nispeten daha düşük antioksidan aktivite göstermiştir. Ayrıca bu çalışma yapılırken antiinflamatuar aktivite çalışmasının da yapılması sonuçların yorumlanması açısından faydalı olabilirdi.

6. ÖZET

Bu çalışma, Düzce ve çevresinde yetişen ve anti-inflamatuar amaçlı kullanılan bazı bitkilerin total antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, *Plantago major* ssp. *major* ve *Plantago lanceolata*, *Rubus hirtus*, *Hedera helix*, *Morus alba* ve *Sambucus ebulus* türleri incelenmiş olup, bitkilerin toprak üstü kısımları ve yaprakları ayrı ayrı ekstre edilmiştir. Bu bitkilerin antioksidan bileşiklerini ve antioksidan kapasitesini belirlemek için 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH $\cdot$) serbest radikal giderme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD $\cdot^+$) radikal giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikali (O $_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi, folin metodu ile toplam fenolik tayini, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu $^{2+}$) indirgeme kapasitesi, tiyosiyanat metodu ile total antioksidan aktivite kapasite ve kit yardımı ile gerçekleştirilen total antioksidan cevap tayini deneyleri çalışılmıştır. Ayrıca α -tokoferol, vitamin C, gallik asit ve troloks gibi bileşikler referans antioksidanlar olarak kullanılmıştır. Çalışmamızın sonucunda *Plantago lanceolata*, *Rubus hirtus*, *Sambucus ebulus* ve *Plantago major* ssp. *major* benzer fenolik madde içeriğine sahipken, *Morus alba* ve *Hedera helix* nispeten düşük fenolik madde içeriğine sahip bulunmuştur. Genel olarak fenolik madde içeriği yüksek olan *Rubus hirtus* ve *Plantago* türleri yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

7. SUMMARY

This study was prepared to determine natural antioxidant capacity of some plants, which grown in Düzce and surroundings and used as anti-inflammatory. For this purpose, we investigated *Plantago major* ssp. *major*, *P. lanceolata*, *Rubus hirtus*, *Hedera helix*, *Morus alba* and *Sambucus ebulus* plants and the soil upper parts and leaves of these plants were extracted separately. In order to determine the antioxidant compounds and antioxidant capacity of these plants, different in vitro methods such as 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH·) free radical scavenging activity, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) radical scavenging activity, superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity, folin method, cupric ion (Cu^{2+}) reduction capacity by cuprac method, total antioxidant capacity with thiocyanate method and total antioxidant response with the aid the kit were applied. Also α -tocopherol, vitamin C, gallic acid, and trolox were used as the reference antioxidant compounds. As a result of our study, while *Plantago lanceolata*, *Rubus hirtus*, *Sambucus ebulus* and *Plantago major* ssp. *major* had similar to the content of phenolic compounds, *Morus alba* and *Hedera helix* were found to have relatively low content of phenolic compounds. In general, *Plantago* species and *Rubus hirtus* showed high antioxidant activity.

8. KAYNAKLAR

- 1-Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 671-683.
- 2-Hennig B, Toborek M. Antioxidants and atherosclerosis, *J Opt Nutrit* 1993; 2: 213-216.
- 3-Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radicalbiochemistry. *British Medic Bullet* 1993; 49: 481-493.
- 4-Murthy MRV. Coenzyme-Q and related isoprenoid compounds: biosynthesis, regulation, functions and biomedical implications. In: Ebadi M, Marwah J, Chopra R, editors. *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q-10)*. Arizona: Prominent Press; 2001b. pp. 231– 346.
- 5-Cui K, Luo X, Xu K, Murthy Ven MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2004; 8: 771–799
- 6-Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819– 1828.
- 7-Surveswaran S, Cai Y, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 2007; 102: 938-953.
- 8-Park EJ, Pezzutto JM. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metast Rev* 2002; 21: 231-255.

- 9-Dimayuga RE, Garcia SK. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. *J Ethnopharmacol* 1991; 181-192.
- 10-Ceylan S, Hamzaoğlu O, Kömürcü S, Beyan C, Yalçın A. Survey of the use of complementary and alternative medicine among Turkish cancer patients. *Complement Therapi Medic* 2002; 10: 94-99
- 11-Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-89.
- 12-Hull DS. Oxygen free radicals and corneal endothelium. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990; 88: 463-511.
- 13-Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford: Oxford Science Publications; 2001.
- 14-Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6): 598-620.
- 15-Hull DS, Green K, Laughter L. Cornea endothelial rose bengal photosensitization: Effect of permeability, sodium flux, and ultrastructure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 455-460.
- 16-Pooler JP, Valenzano DP. Titration of sodium channel sites for hydrogen ion block and sensitized photochemical modification of lobster axons. *Biochim Biophys Acta* 1979; 555: 307-315.
- 17-Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. 1. baskı. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.

- 18-Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. Scand Acto Neurol 1989; 126: 23-33.
- 19-Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine .2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
- 20-Alhan C, Şan M. Kroner Kalp Hastalığı Tedavisinde Anti-Oksidanlar Yararlı mı? T Klin Kardiyoloji 2002; 15: 203-213.
- 21-Kılınç K, Kılınç A. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Derg 2002; 33(2): 110-118.
- 22-Sigel H, Sigel A. Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes. 2nd edition. Boca Raton FL: CRC Press; 1999.
- 23-Pryor WA. editors. Free Radicals in Biology. New York: Academic Press; 1982.
- 24-Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Cell Signal 2007; 19 (9): 1807-1819.
- 25-Temür N. Çam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (*Viscum album* L.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans. Eskişehir: Gaziosmanpaşa Üniversitesi;2006.
- 26-Shih MK, Hu ML. Relative roles of metal ions and singlet oxygen in UVA-induced liposomal lipid peroxidation. J Inorg Biochem 1999; 77 (3- 4): 225-230.

- 27-Das KC. Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem and Biophys Res Commun* 2000; 277 (2), 443-447.
- 28-Colton CA. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. Netlibrary. Incorporated 1999; 0585313075.
- 29-Nobel PS. *Introduction to Biophysical Plant Physiology*. Kennedy D, Ve Park RB. editors. San Fransisco: Freeman and Company; 1974.
- 30-Girotti AW. Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Medic* 1985; 1 (2): 87-95.
- 31-Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem* 1989; 28: 1057–1060.
- 32-Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 1999; 207: 604–611.
- 33-Shih MK, Hu ML. Relative roles of metal ions and singlet oxygen in UVA-induced liposomal lipid peroxidation. *J Inorg Biochem* 1999; 77 (3- 4): 225-230.
- 34-Apel K. Singlet oxygen and the activation of genetically controlled stres programs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2004; 45: 1–11.
- 35-Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth edition. New York: W.H. Freeman and Company; 2004.

- 36-Getoff N. Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals. Radiat Phys and Chem 2007; 76 (10): 1577-1586.
- 37-Lin AJ, Zhang XH, Chen MM, Cao Q. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. J Environ Sci 2007; 19 (5): 596-602.
- 38-Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem-Biol Interact 2006; 160 (1): 1-40.
- 39-Loeckie L, De Zwart John H. et Al. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Human. Free Radical Bio Med 1999; 26: 202-226.
- 40-Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC. The Potential of the Hydrocarbon Breath Test as a Measure of Lipid Peroxidation. Free Radical Biol Med 1994; 17: 127–160.
- 41-Fantel AG. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. Teratology.1996; 53: 96–217.
- 42-Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem 1997; 272: 18515-18517.
- 43-Yalçın MS. Hepatitli Hastalarda Antioksidan Enzimlerinin Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz (CAT) Aktivite Düzeylerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans. Adana: Çukurova Üniversitesi; 2007.

- 44-Oğuzlar H, Antalya'da YetiŖen Areceae *Arum dioscorides* Tohumlarının Antioksidan Aktivitesi Ve Toplam Fenolik Madde Tayini. Yüksek Lisans. Konya: Selçuk Üniversitesi; 2008.
- 45-Köksal E. Purification and characterisation of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) and determination of their antioxidant and antiradical activities. PhD Thesis. Erzurum: Atatürk University; 2007.
- 46-Haigh R. Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. Food Chem Toxicol 1986; 24: 1031-1036.
- 47-Gökalp HY, Çakmakcı S. Gıdalarda kısaca Oksidasyon: Antioksidantlar ve Gıda Sanayinde Kullanımları. Atatürk Üniver Ziraat Fak Derg 1992; 23(2): 174-192.
- 48-Shahidi F. and Naczki M. Food Phenolics. USA: A Technomic Publication; 1995.
- 49-Khan MH, Shahidi F. Effects of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Borage and Evening Primrose Triacylglycerols. Food Chem 2001; 75: 421-437.
- 50-Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidants in Food. USA: CRC Press; 2001.
- 51-Altuğ T. Gıda Katkı Maddeleri. İzmir Bornova: Meta Basım; 2001.
- 52-Hall III C. Source of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. J Pokorny, N Yanishlieva and M Gordon editors. Antioxidants in Food. Practical

Applications. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2001. pp 169-219.

53-Gerber M, Boutron-Ruault MC, Hercberg S, Riboli E, Scalbert A, Siess M H. Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *B Cancer* 2002; 89: 293–312.

54-Hatano T, Edamatsu R, Mori A, Fujita Y, Yasuhara E. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chem Pharm Bull* 1989; 37: 2016-2021.

55-Rice-Evans CA. Screening of Phenolic and Flavonoids for Antioxidant Activity. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. editors USA: Academic Press; 1999.

56-Satué-Gracia MT, Heinonen M, Frankel EN. Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin Liposome Systems. *J Agric Food Chem* 1997; 80: 1063-1072.

57-Chen JH, Ho CT. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 2374-2378.

58-Bodannes R, Chan P. Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Letters* 1979; 105, 2.

59-Olmos E, Piqueras A, Martínez-Solano JR, Hellín E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydric leaves of regenerated carnation plants. *Plant Sci* 1997; 130: 97–105.

- 60-Sarma AD, Sreelakshmi Y, Sharma R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochem* 1997; 45 (4): 671-674.
- 61-Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol* 1998; 49: 249-279.
- 62-Garnczarska M, Ratajczak L. Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions I. Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes. *Acta Physiol Plant* 2000; 22 (4): 423–427.
- 63-Koca N. Karadeniz F. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda* 2005; 30(4): 229-236.
- 64-Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* vol.6. 37 s. Edinburgh University Pres: Edinburgh; 1978.
- 65- Yörüker M. S. *Rubus hirtus* Waldst. & Kıt. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Yüksek Lisans. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2006.
- 66-Erdemoğlu N, Küpeli E, Yeşilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J Ethnopharmacol* 2003; 89: 123–129.
- 67-Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* vol.4. 542 s. Edinburgh University Pres: Edinburgh; 1972.
- 68-Radu A, Tamas M, Otlacan A. Comparative study of flavones indigenous elder flowers (*S.nigra* L., *S. ebulus* L., *S. racemosa* L.). *Farmacia* (Bucharest). 1976; 24: 9-15.

- 69-Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M, Salimi E. Antiinflammatory activity of *Sambucus ebulus* hexane extracts. *Fitoterapia* 2006; 77: 146–148.
- 70-Peşin Sutar İ, Kupeli Akkola E, Yalçın FN, Koca U, Keleş H, Yeşilada E. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *J Ethnopharmacol* 2010; 129 :106–114.
- 71-Schwaiger S, Zeller I, Pölzelbauer P, Frotschnig S, Laufer G, Messner B, Pieri V, Stuppner H, Bernhard D. Identification and pharmacological characterization of the anti-inflammatory principal of the leaves of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *J Ethnopharmacol* 2011; 27;133(2):704-9.
- 72-Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean islands* vol.7. 507 s. Edinburgh University Press: Edinburgh; 1982.
- 73-http://en.wikipedia.org/wiki/Plantago_major
- 74-María Elena Núñez Guillén, José Artur da Silva Emim, Caden Souccar and Antonio José Lapa, Analgesic And Antiinflammatory Activities Of The Aqueous Extract Of *Plantago major* L. *Pharm Biol* 1997; 35. 2: 99-104.
- 75-Türel İ, Özbek H, Erten R, Öner A C, Cengiz N, Yilmaz O. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian J Pharmacol* 2009; 41(3):120-4.
- 76-Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Res* 2002; 55(1): 53-62.

- 77-Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. J Ethnopharmacol 2000; 71(1-2): 1-21.
- 78-Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean islands vol.7. 513 s. Edinburgh University Pres: Edinburgh; 1982.
- 79-Karademir ES. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayini. Yüksek Lisans. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2005
- 80-Melese E, Asres K, Asad M, Engidawork E. Evaluation of the Anti-peptic Ulcer Activity of the Leaf Extract of *Plantago lanceolata* L. in Rodents. Phytother Res 2011; 10:1002/ptr.3411.
- 81-Beara I N, Orčić DZ, Lesjak MM, Mimica-Dukić NM, Peković BA, Popović MR. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of plantain (*Plantago* L.) species., J Pharm Biomed Anal 2010; 52(5):701-6.
- 82-Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands vol.4. 538-539 s. Edinburgh University Pres: Edinburgh; 1972.
- 83-Süleyman H, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R, Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix* L, in rats. Phytomedicine 2003; 10: 370–374.
- 84-Holzinger F, Chenot JF. Systematic Review of Clinical Trials Assessing the Effectiveness of Ivy Leaf (*Hedera helix* L) for Acute Upper Respiratory Tract Infections. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2010; 2011: 9.

- 85-Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands vol.7. 641 s.
Edinburgh University Pres: Edinburgh; 1982.
- 86-Xiaolan Y, Jikan Z, Wenli M. The Composition and Some Characteristics of the Seeds and the Seed-Oil of *Morus alba* L. J Chinese Cereals Ois Associat 1998; 13(4): 43–45.
- 87-Gow-Chin Y, She-Ching W, Pin-Der D. Extraction and Identification of Antioxidant Components from the Leaves of Mulberry (*Morus alba* L.). J Agric Food Chem 1996; 44: 1687-1690.
- 88-Ana Lúcia B, Dall’Molin ZM. Hypotriglyceridemic effect of *Morus alba* L, Moraceae, leaves in hyperlipidemic rats. Braz J Pharmacogn 2010; 20(1): 130-133.
- 89-Yıldız L. Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitenin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini. Yüksek Lisans. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2007.
- 90-Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. A J Enol and Viticult 1965; 16: 144-158.
- 91-Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Method Enzymol 1999; 299: 152-178.
- 92- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their

cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. J Agric Food Chem 2004; 52: 7970-7981.

93-Miller NJ, Rice Evans CA. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Method Enzymol 1994; 234: 279-293.

94-Miller NJ, Rice Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner AA. Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 1993; 84: 407-412.

95-Ünal EL. Türkiye Florasında Doğal Olarak Yetişen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2006.

96-Matthaus B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J Agric Food Chem 2002; 50: 3444-3452.

97-Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring antioxidant capacity of wines. J Agric Food Chem 1999; 47: 1035–1040.

98-Duh PD, Yen GC. Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) varieties in soybean oil emulsion. Food Chem 1999; 66: 471-476.

99-Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JF. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis 1989; 10: 1003–1008.

- 100-Erel Ö. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clin Biochem 2004; 37: 112–9.
- 101-Kulkarni SD, Tilak JC, Acharya R, Rajurkar NS, Devasagayam TPA, Reddy AVR. Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as an aunction of growth under different conditions. Phytother Res 2006; 20: 218–227.
- 102-Gülçin İ. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. Int J Food Sci Nutr 2005; 56 (7): 491-499.
- 103-Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology 2006b; 217: 213-220.
- 104-Gülçin İ, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber. Phytomedicine 2006c;13: 343-351.
- 105-Kardosová A, Machová E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. Fitoterapia 2006;77(5):367-73.
- 106-Herold A, Cremer L, Calugăru A, Tamaş V, Ionescu F, Manea S, Szegli G. Antioxidant properties of some hydroalcoholic plant extracts with antiinflammatory activity. Roum Arch Microbiol Immunol 2003; 62(3-4):217-27.
- 107-Vigo E, Cepeda A, Gualillo O, Perez-Fernandez R. In-vitro anti-inflammatory activity of *Pinus sylvestris* and *Plantago lanceolata*

extracts: effect on inducible NOS, COX-1, COX-2 and their products in J774A.1 murine macrophages. J Pharm Pharmacol 2005;57(3):383-91.

108-Gálvez M, Martín-Cordero C, Houghton PJ, Ayuso MJ. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. J Agric Food Chem 2005; 23;53(6):1927-33.

109-Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. J Ethnopharmacol 2000;71(1-2):1-21.

110-Korogodina VL, Bamblevskii VP, Grishina IV, Gustova MV, Zabaluev SA, Korogodin VI, Kuraeva TV, Lozovskaia EL, Maslov OD. The antioxidant status of the seeds in populations of the great plantain (*Plantago major* L.) growing in an area exposed to the Balakovo Atomic Electric Power Station and to chemical enterprises. Radiats Biol Radioecol 2000;40(3):334-8.

111-Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. Antiviral Res 2002; 55(1): 53-62.

112-Park BG, Lee HS, Jung SH, Hong CO, Won HJ, Park HY, Ryu YS, Lee SJ, Kim KH, Park KW, Lee KWA 90 day repeated oral toxicity study on plantamajoside concentrate from *Plantago asiatica*. Phytother Res 2007; 21(12):1118-23.

113-Campos AM, Lissi EA. Evaluation of the antioxidant capacity of herbal teas by a procedure based on the bleaching of ABTS radical cations. Bol Soc Chil Quim 1995; 40 (4): 375-381.

- 114-Beara I N, Lesjak MM, Jovin ED, Balog KJ, Anackov GT, Orčić DZ, Mimica-Dukić NM. Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. J Agric Food Chem 2009 ;14;57:9268-73.
- 115- Gao J, Sun CR, Yang JH, Shi JM, Du YG, Zhang YY, Li JH, Wan HT. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activities of *Rubus parvifolius* L. J Zhejiang Univ Sci B 2011; 12 (2):135-42.
- 116-Argoti JC, Salido S, Linares-Palomino PJ, Ramírez B, Insuasty B, Altarejos J. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants. J Sci Food Agric. [2011-May 20]. doi: 10.1002/jsfa.4476.
- 117-Serteser A, Kargioğlu M, Gök V, Bağcı Y, Özcan MM, Arslan D. Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey. Int J Food Sci Nutr. 2008; 59(7-8):643-51.
- 118-Ferreira DS, De Rosso VV, Mercadante AZ. Compostos Bioativos Presentes Em Amora-Preta (*Rubus* Spp.) Rev Bras Frutic Jaboticabal 2010; 32, 3: 664-674.
- 119-Schmeda-Hirschmann G, Feresin G, Tapia A, Hilgert N, Theoduloz C. Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. J Sci Food Agric 2005; 85:1357–1364.
- 120-Erdemoglu N, Küpeli E, Yeşilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. J Ethnopharmacol 2003;89(1):123-9.

- 121-Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. *Pak J Biol Sci* 2009; 1;12(5): 447-50.
- 122-HosseiniMehr SJ, Pourmorad F, Shahabimajd N, Shahrbandy K, Hosseinzadeh R. In vitro antioxidant activity of *Polygonum hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha spicata* and *Phytolacca americana*. *Pak J Biol Sci* 2007; 15;10(4):637-40.
- 123-Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, Gerova D, Galunska B, Yankova T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res* 2006;20(11): 961-5.
- 124-Gülçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(beta-D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytother Res* 2006; 20(2):130-4.
- 125-Gülçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med* 2004 70(6):561-3.
- 126-Amara-Mokrane YA, Lehucher-Michel MP, Balansard G, Duménil G, Botta A. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 1996;11(2):161-7.
- 127-Mendel M, Chłopecka M, Dziekan N, Wiechetek M. The effect of the whole extract of common ivy (*Hedera helix*) leaves and selected

active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips. J Ethnopharmacol 2011; 12;134(3):796-802

128-Dugo P, Donato P, Cacciola F, Germanò MP, Rapisarda A, Mondello L. Characterization of the polyphenolic fraction of *Morus alba* leaves extracts by HPLC coupled to a hybrid IT-TOF MS system. J Sep Sci. 2009; 32(21):3627-34.

129-Naowaratwattana W, De-Eknamkul W, De Mejia EG. Phenolic-containing organic extracts of mulberry (*Morus alba* L.) leaves inhibit HepG2 hepatoma cells through G2/M phase arrest, induction of apoptosis, and inhibition of topoisomerase II α activity. J Med Food 2010;13(5):1045-56.

130-Pirvulescu M M, Gan A M, Stan D, Simion V, Calin M, Butoi E, Tirgoviste CI, Manduteanu I. *Curcumin* and a *Morus alba* Extract Reduce Pro-Inflammatory Effects of Resistin in Human Endothelial Cells. Phytother Res [2011 Mar 28.] doi: 10.1002/ptr.3463.

131-Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. Food Chem Toxicol 2010;48(8-9):2374-9.

132-Imran M, Khan H, Shah M, Khan R, Khan F. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. J Zhejiang Univ Sci B. 2010;11(12):973-80.

133-Loganayaki N, Manian S. In vitro Antioxidant Properties of Indigenous Underutilized Fruits. Food Sci. Biotechnol 2010; 19(3): 725-734.

- 134-Wei F, Yong FL, Ya LC, Dao NZ, Jin LR. A new alkylene dihydrofuran glycoside with antioxidation activity from the root bark of *Morus alba* L. Chin Chem Lett 2010; 21:821–823.
- 135-Chang LW, Juang LJ, Wang BS, Wang MY, Tai HM, Hung WJ, Chen YJ, Huang MH. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. Food Chem Toxicol 2011;49(4):785-90.
- 136-Singab AN, Ayoub NA, Ali EN, Mostafa NM. Antioxidant and hepatoprotective activities of Egyptian moraceous plants against carbon tetrachloride-induced oxidative stress and liver damage in rats. Pharm Biol 2010;48(11):1255-64.

9.EKLER

9.1 TEŞEKKÜR

Tez konumun belirleyen, çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yön veren, hiç bir konuda desteğini esirmeyen danışman hocam Doç. Dr. Sevgi AKAYDIN'a ve bu aşamalara gelmemde büyük payı olan tezime çalışılan bitkileri birlikte toplayarak ve çektiği fotoğraflarla katkıda bulunan lisans hocam Doç. Dr. Galip AKAYDIN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Projede görev almamı sağlayan proje yöneticisi sayın hocam Prof. Dr. İlhan GÜRBÜZ'e teşekkür ederim.

Bu süreçte her konuda yanımda olan ve bana yol gösteren Uzm. Ecz. Emel ÇALIŞKAN CAN'a ve maddi ve manevi destekleri ile hayatımın tüm aşamalarında yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı: Ece

Soyadı: Miser

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 06.04.1983

Eğitimi: 2001-2007 Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi OFMA

Bölümü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı

1997-2001 Anıttepe Lisesi (YDA)

1994-1997 Turhan Fevzioğlu İlköğretim Okulu

1989-1994 Dikmen Merkez İlkokulu

Yabancı Dili: Almanca, İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri: Düzce İli ve İlçeleri Halk İlaçları (TÜBİTAK-2009) projesinde bursiyer öğrenci olarak görev aldı.