

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALABAŞ (*Brassica oleracea var. Gongylodes*) BİTKİSİNİN
ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ

Gülçin AKAGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2009

ÖZET

Bu çalışma kapsamında alabaş (*Brassica oleracea var. Gongylodes*) bitkisinin antioksidan aktivitesi çeşitli metodlarla incelenmiştir. Bu amaçla bitkinin taze yaprak ve gövdesinin ayrı ayrı, etanol, metanol, aseton ve su çözücüleri kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Her bir ekstraktın Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) ile toplam fenolik madde içeriği, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, indirgeme gücü, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi ve β -Karoten ağartma yöntemi kullanılarak antioksidan aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar standart madde olarak kullanılan C vitamini, E vitamini, BHA ve BHT ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Etanol, metanol, aseton ve su ile yapılan ekstraksiyonlar sonunda bitkinin kurutulmuş yaprak ve gövdesinden ekstrakte edilebilen maddelerin yüzde verimi; sırasıyla % 3,05-% 8,619 arasında bulunmuştur.

Yaprak ve gövde ekstraktlarının fenolik madde içerikleri toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak hesaplandı. En yüksek fenolik madde içeriği yaprağın aseton ekstraktında tayin edildi.

DPPH radikali giderme aktivitesinin tayin sonuçları; gövde ekstraktları arasında en iyi aktiviteye metanol ekstraktının, yaprak ekstraktları arasında ise aseton ve etanol ekstraktlarının sahip olduğunu göstermiştir. Standart maddelere yakın aktivite gösteren ekstraktlar; yaprağın aseton, etanol ve metanol ekstraktlarıdır.

Metal şelatlama aktivitesi deneyinde, standartlara en yakın aktivite gösteren ekstrakt yaprağın su ekstraktıdır. Yaprak ve gövde kısımları kendi aralarında kıyaslandıklarında ise her ikisinde de en iyi aktiviteyi su ekstraktları göstermiştir.

β -Karoten ağartma yöntemi kullanılarak yapılan antioksidan aktivite tayininde gövde ekstraktları aktivite göstermezken, yaprak ekstraktları aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite yaprağın su ekstraktında gözlenmiştir.

Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayininde; elde edilen verilere göre yaprak ve gövde rneği ayrı ayrı incelendiğinde her ikisinde de en yüksek aktiviteyi su ekstraktlarının gösterdiği gözlenmiştir.

Ekstraktların indirgeme gücü tayininde; ekstraktların aktiviteleri standartlarla karşılaştırıldığında düşük aktiviteye sahip oldukları gözlendi. Kendi aralarında incelendiğinde yaprağın aktivitesinin gövdeden yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Alabaş, (*Brassica oleracea var. Gongylodes*), antioksidan aktivite, DPPH radikali giderme aktivitesi, fenolik madde

ABSTRACT

In this study, antioxidant activities of kohlrabi (*Brassica oleracea var. Gongylodes*) were investigated by using different methods. For this purpose, the extractions were done from leaves and stem of the fresh plant by using water, ethanol and acetone as solvent. The antioxidant activities of all extracts were assayed with the various methods including total phenolic compound contents by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), DPPH free radical scavenging activity, reducing capacity, metal chelating capacity, superoxide anion scavenging activity, and β -caroten bleaching test. The obtained results were compared by using the vitamins C and E, BHT and BHA as standard materials.

Percentage yield of extractable compound of all studied plants were found in the range between 3,05 % and 8,619 % mg/g from dried leaves and stem of kohlrabi at the end of the extractions carried out by water, ethanol, methanol and acetone as solvent.

Total phenolic compound amounts of leave and stem extracts were determined as gallic acid equivalent. The highest phenolic compound amounts were found in the acetone extract of the leave.

The assay result of DPPH radical scavenging activity showed methanol extract had the best activity among the stem extracts; and acetone and ethanol extracts had the best activity among the leave extracts. The extracts which showed an activity nearly the standard materials were the acetone and ethanol extracts of the leave.

In metal chelating activity experiment, the water extract of the leaves showed an activity near the standards. When compared in each other, the water extracts of leaves and stem showed the best activity.

In the assay of total antioxidant activity done with β -carotene bleaching test, the stem extracts didn't show any activity but leave extracts showed. The best activity was observed in the water extract of leaves.

According to the data for the measurement of superoxide anion scavenging activity, the water extracts of leave and stem showed the best activity.

When the reducing power assays of the extracts were examined, extracts, when compared with the standards, were observed low activity. Leave activity was higher than the stem activity.

Key words: Kohlrabi, *Brassica oleracea var. Gongylodes*, antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity, phenolic compound.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR	x
1. Giriş	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Canlılık ve Oksijen	3
2.1.1. Moleküler oksijenin özellikleri.....	3
2.2. Serbest Radikaller	4
2.2.1 Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri.....	5
2.2.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	7
2.2.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	8
2.2.1.3. Hidroksil radikali (OH^{\cdot}).....	9
2.2.1.4. Singlet oksijen (1O_2).....	10
2.2.1.5 Hipoklorik asit ($HOCl$).....	11
2.2.1.6. Nitrik oksit (NO^{\cdot}).....	11
2.2.2. Organizmada reaktif oksijen türlerinin (ROT) kaynakları.....	12
2.2.2.1. Biyolojik kaynaklar.....	12
2.2.2.2. Hücreiçi kaynaklar.....	13
2.2.3. Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri.....	14
2.2.3.1. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri.....	16
2.2.3.2. Serbest radikallerin lipidlere etkisi.....	16
2.2.3.3. Serbest radikallerin proteinlere etkileri.....	18

2.2.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri.....	18
2.3. Oksidatif Stres	19
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	20
2.4.1. Antioksidanların etki tipleri.....	20
2.4.2. Antioksidanların sınıflandırılması.....	21
2.4.2.1. Endojen antioksidanlar.....	22
2.4.2.1.1. Enzimler.....	22
2.4.2.1.2. Enzim olmayanlar.....	24
2.4.2.2. Eksojen antioksidanlar.....	25
2.4.2.2.1. Vitaminler.....	25
2.4.2.2.2. İlaçlar.....	27
2.4.2.2.3. Gıdalardaki antioksidanlar	27
2.5. Tükettiğimiz Besinler ve Antioksidanlar.....	29
2.5.1. Antioksidan aktivite tayin metodları.....	30
2.5.1.1. HAT-temelli metodlar.....	32
2.5.1.2. ET-temelli metodlar.....	32
2.5.1.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar.....	32
2.5.1.4. Diğer ROT giderici kapasiteleri ölçen metodlar.....	33
2.6 Alabaş (<i>Brassica oleracea var. Gongylodes</i>).....	33
3. MATERYAL VE METOD.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Bitki Örneği.....	35
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	35
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler.....	35
3.2. Metod	37
3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı.....	37
3.2.2. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini	38
3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini.....	39
3.2.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	39
3.2.5. β -Karoten Ağartma Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini.....	40
3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	41

3.2.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini	42
3.2.8. Değerlendirme	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	43
4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini	43
4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi.....	45
4.3. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	47
4.4. . . β-Karoten Ağartma Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini	49
4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	51
4.6. İndirgeme Kapasitesi Tayini.....	52
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	55
6. KAYNAKLAR.....	62
7. TEŞEKKÜR.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No	
Şekil 2.1	Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu	6
Şekil 2.2	Fagostik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri	12
Şekil 2.3	Serbest radikallerin hücresel hedefleri	15
Şekil 2.4	Oksidatif stres durumu	19
Şekil 2.5	Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları	23
Şekil 2.6	Alabaş bitkisi	33
Şekil 4.1	Gallik asit standart grafiği	44
Şekil 4.2	Bitki ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri	44
Şekil 4.3	Yaprak ekstraktlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi	45
Şekil 4.4	Gövde ekstraktlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi	46
Şekil 4.5	Yaprak ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi	48
Şekil 4.6	Gövde ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi	48
Şekil 4.7	Alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının EDTA eşdeğeri olarak metal şelatlama kapasitesi	49
Şekil 4.8	Yaprak ekstraktlarının β -karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitesi	50
Şekil 4.9	Gövde ekstraktlarının β -karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitesi.	50
Şekil 4.10	Yaprak ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktivitesi	51
Şekil 4.11	Gövde ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktivitesi	52
Şekil 4.12	Yaprak ekstraktlarının indirgeme kapasitesi	53
Şekil 4.13	Gövde ekstraktlarının indirgeme kapasitesi	53

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Bazı önemli reaktif oksijen türleri	7
Tablo 2.2. In vitro koşullarda uygulanan antioksidan aktivite tayin metodları	31
Tablo 4.1. Yaprak ve gövde ekstraktlarının çeşitli çözücülerdeki % ekstraksiyon verimi	43
Tablo 4.2. Alabaş ekstraktları ve standartların EC ₅₀ değerleri tablosu	47

KISALTMALAR

BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	Demir (III)'ü indirgeyici antioksidan güç
GAE	Gallik asit eşdeğeri
G-SH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Red	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon-S-transferaz
NADH	Nikotin adenin dinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolyum
ORAC	Oksijen radikali absorblama kapasitesi
PG	Propil gallat
PMS	Fenazin metasülfat
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	t-bütil hidroksikinon
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TPC	Toplam fenolik madde
TRAP	Toplam radikal absorbsiyon kapasitesi

1. GİRİŞ

Hücrelerin tümünde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller oluşur. Oluşan bu serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA ile etkileşimi sonucunda bu hayati moleküller zarara uğrar, normal fonksiyonları bozulur. Son yıllarda serbest radikaller ve bunların insan sağlığı açısından zararları giderek önem kazanmış, ateroskleroz, diyabet, kanser ve yaşlanma gibi birçok durumun mekanizmasının altında serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların olduğu öne sürülmüştür. İnsan vücudu, sürekli olarak dış kaynaklı (güneş ışınları, radyasyon ve kirlenme) ve endojen olarak üretilen reaktif oksijen türlerine maruz kaldığı için reaktif oksijen türlerinin başlattığı doku hasarı birçok hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır (Akkuş, 2000).

Antioksidanlar ise bu şekilde gelişen hücre hasarının önlenmesinde rol oynar. Süperoksitler, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşturdukları hasara karşı koruyucu olan bu moleküller, reaktif oksijen türlerini temizlemek veya okside bileşikleri indirgemek yoluyla işlev yaparlar. Antioksidan moleküller, serbest radikallerle etkileşime girerek zincir reaksiyonunu sona erdirirler; kendi elektronlarını vermek suretiyle serbest radikalleri nötralize ederler ve hayati molekülleri hasardan korurlar (Akkuş, 2000).

Bitkiler, polifenoller, karotenoidler, tokoferoller, glutatyon, askorbik asit ve antioksidan aktiviteye sahip olan enzimler gibi antioksidan bileşiklerce zengindir. Hayvan hücresi ise, antioksidan üretimi açısından oldukça sınırlıdır. Vücutta serbest radikal hasarına karşı koruyucu olan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzim sistemleri ile beraber başlıca nonenzimatik olarak üretilen antioksidanlar; E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbik asit), N-asetil sistein, ürik asit, ubikinol, glutatyon, lipoik asit, ferritin ve transferrin gibi plazma proteinleri vardır. Bir eser element olan selenyum da antioksidan enzim sistemlerinden glutatyon peroksidazın çalışması için gerekli olduğundan bu sınıfa girer. İnsan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korumada doğal ve fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzelerin

yararlı olduğu bilinmektedir. Günlük beslenmede antioksidan bileşiklerce zengin bu bitkisel besinler yeterince alınmadığı takdirde; reaktif oksijen türleri ile bu antioksidan savunma sistemi arasındaki denge bozulabilir, bu durumda oksidatif hasar kaçınılmaz olur (Arbos, vd., 2008).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri C vitamini, E vitamini, karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler, lipoik asit, riboflavin, selenyum ve çinko gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir (Halvorsen vd., 2002). Düzenli ve dengeli bir diyetle alınacak antioksidan bileşikler tarafından vücudun endojen savunma sisteminin desteklenmesi gerekliliği anlaşılmıştır. Bu sebeple son yıllarda antioksidan alımını arttırmış olup; antioksidanlarla zenginleştirilmiş gıdalar giderek önem kazanmıştır.

Karnabahar, lahana, brokoli, turp, brüksel lahanası gibi günlük beslenmede yer tutan pek çok sebzeyi kapsayan *Brassicaceae* ailesi, antioksidan içerikleri ve bol lifli yapıları nedeniyle düzenli insan beslenmesinde çok önemli türlerdir. Alabaş bitkisi (*Brassica oleracea var. Gongylodes*) de bu ailenin yesi olup antioksidan aktivite potansiyeli araştırılmamış bir sebzedir.

Bu tez kapsamında, ülkemizde son yıllarda tanınan ve günlük beslenmede yeni yer almaya başlayan alabaş bitkisinin gövde ve yapraklarının çeşitli metodlarla antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve bu bitki ekstraktlarının sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek doğal antioksidan kaynağı olup olamayacağı incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Canlılık ve Oksijen

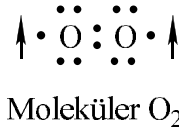
Oksijen; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik maddelerin temel elementidir. Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati önem taşıyan oksijen, tüm canlılar için vazgeçilmez bir elementtir (Url 2).

Tüm canlı türleri, organik moleküllerin içindeki oksijene ihtiyaç duyarlar fakat aynı durum serbest haldeki moleküler oksijen için söz konusu değildir. Aerobik canlılar, yaşamlarını sürdürmek için moleküler oksijene bağımlıyken, anaerobik canlıların moleküler oksijene bağımlılığı yoktur (url 2).

Aerobik canlılığın devamı için havadaki moleküler oksijen (O_2) tüketilir. Alınan oksijenin % 90'ından fazlası elektron transport zincirinde (solunum zinciri), % 5-10'u da vücuttaki diğer reaksiyonlarda kullanılır (Url 4).

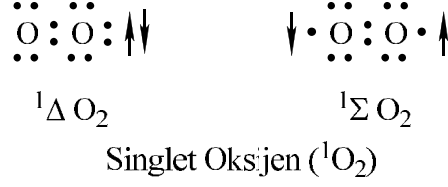
2.1.1. Moleküler oksijenin özellikleri

Moleküler oksijen (O_2), her iki atomunda da paralel spinli iki ortaklanmamış elektrona sahip oksijendir.



Moleküler oksijen, serbest radikal tanımına göre bir biradikal olarak değerlendirilir. Serbest radikallerle kolayca reaksiyona giren biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girer.

Biradikal oksijenin elektrotlarından biri, ters spin yönlü bir orbitale geçtiğinde singlet oksijen oluşur. Singlet oksijenin eşlenmemiş elektronu yoktur bu nedenle radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır.



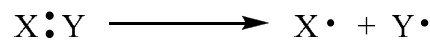
Organizmadaki Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metalleri içeren enzimler yardımıyla moleküler oksijen, biradikal olmanın özelliği dolayısıyla yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir (Url 4).

2.2. Serbest Radikaller

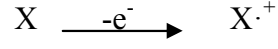
Serbest radikaller; dış orbitalinde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom ya da moleküllerdir. Bu tip atom ya da moleküller ortaklanmamış elektronları dolayısıyla oldukça reaktiftirler. Bir protonu ve bir elektronu bulunan hidrojen atomu en basit serbest radikaldir. Ortaklanmamış elektron, genel olarak atom veya molekülün üst kısmına konulan bir nokta ile gösterilir.

Dış çevrede ve hücre içinde, çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar sonucu sürekli olarak serbest radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir;

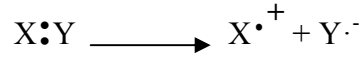
a) Kovalent bağlı bir molekülün, ortak elektronların her birinin ayrı atomlarda kalacak şekilde homolitik kırılması ile



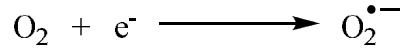
b) Normal bir molekülün bir elektron kaybetmesi



veya kovalent bağı oluşturan iki atomun bağdaki elektronlarının ikisinin birden aynı atomda kalarak heterolitik bölünme ile;



c) Radikal özelliği taşımayan bir moleküle bir elektron transferi sonucu dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşmasıyla.

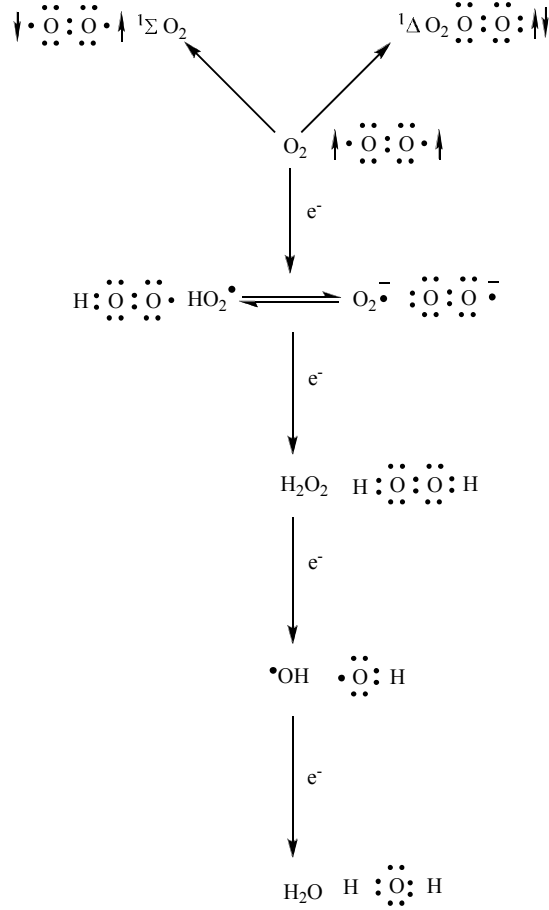


Serbest radikaller, biyolojik sistemlerde en sık elektron transferiyle meydana gelir. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilir. Biyolojik sistemlerde serbest oksijen moleküllerinin yanı sıra Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} gibi inorganik moleküller de vardır. Bunlar ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmez, fakat reaksiyonları katalizleyerek serbest radikal oluşumunda önemli rol alırlar (Akkuş, 2000).

2.2.1 Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

Canlı organizmalardaki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijenin indirgenme ara ürünleri; bağımsız, kısa ömürlü, reaktif atom ve moleküller serbest oksijen radikalleri olarak tanımlanır. Serbest oksijen radikali biyokimyasının kilit molekülleri; oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördü çeşitli reaksiyonlarda hidroksil radikalini oluşturur (Türkyılmaz, 2007).

Reaktif oksijen türleri (ROT), normal oksijen metabolizması esnasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir (Url 4). Oksijenin bir, iki veya üç elektron ile reaksiyona girmesiyle sırasıyla süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşur (Türkyılmaz, 2007). Bu oluşumun reaksiyonu Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu (İşbilir, 2008).

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin meydana geldiği serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), peroksit radikalleri (ROO^{\cdot}), sülfenil radikalleri (RSO^{\cdot}), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^{\cdot}) gibi çeşitli diğer serbest radikallerin oluşumuna sebep olur (Akkuş, 1995). Önemli reaktif oksijen türleri Tablo 2.1'de görülmektedir. Bazı radikal türleri biraz daha ayrıntılı incelenecektir.

Tablo 2.1. Bazı önemli reaktif oksijen türleri (Nehir El vd., 1999)

Serbest Radikaller	
Hidroksil radikali	$\text{OH}\cdot$
Süperoksit radikali	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Nitrik oksit radikali	$\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$
Peroksil, alkoksil radikali	$\text{RO}_2\cdot$, RO
Triklorometil radikali	$\cdot\text{CCl}_3$
Hidrojen atomu radikali	$\text{H}\cdot$
Radikal olmayanlar	
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$
Hipoklor asit	HOCl
Ozon	O_3

2.2.1.1. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali, neredeyse tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur. Çevredeki ve hücredeki, enzimatik ve nonenzimatik reaksiyonlarda en kolay oluşan radikaldir. Milisaniyelik bir yarı ömre sahiptir. Zayıf bir oksidan olmasına rağmen güçlü bir indirgendir.

Süperoksit bir serbest radikal olsa da çok toksik etkili değildir ve direkt olarak zarar vermez, daha güçlü oksijen metabolitlerini açığa çıkararak etki gösterir. Asıl önemi; H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metal iyonları redüktanı olmasından gelmektedir (Türkyılmaz, 2007; Url 3).

Süperoksit radikali başlıca dört tip mekanizma sonunda oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1990, Halliwell, 1994). Bunlar aşağıda sıralanmıştır.

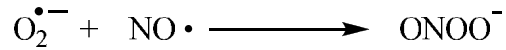
a) Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller gibi indirgeyici özelliğe sahip biyomoleküller, oksijene tek elektron verip, kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşumuna sebep olur.

b) Başta dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, enzimlerin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali oluşabilir.

c) NAD-dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılarından oksijene, elektron kaçağı olduğu için, mitokondrideki enerji metabolizmasında tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır.

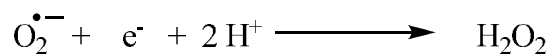
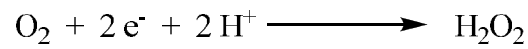
d) Aktive edilen fagositik lökositler çok miktarda süperoksit üreterek fagosom içine ve buldukları ortama verir. Bu radikal yapımı antibakteriyel etki için gereklidir fakat daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Süperoksit fizyolojik bir serbest radikal olan nitrikoksit (NO \cdot) ile birleşerek reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit'i (ONOO $^-$) meydana getirir. Bu şekilde nitrik oksitin normal etkisi inhibe edilmiş olur (Akkuş, 2000).



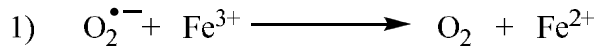
2.2.1.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, , moleküler oksijenin iki ya da süperoksitin bir elektron alması sonucu oluşur. Biyolojik sistemlerde ise genellikle süperoksit radikalinden oluşur.



H₂O₂'in yapısında eşleşmemiş elektron bulunmadığı için radikal değildir ve toksisitesi düşüktür. Fakat hücre membranlarından kolaylıkla geçebilmesi ve uzun ömürlü olması toksisitesini arttırır (Halliwell ve Gutteridge, 1990, Halliwell, 1994).

Hidrojen peroksidin, serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türlerinden biri sayılmasının sebebi; Fe²⁺ veya diğer geçiş metalleri varlığında aşağıdaki Fenton Reaksiyonu ile, süperoksit varlığında ise Haber-Weiss Reaksiyonu ile hidroksil (OH·) radikalini oluşturmasıdır (Halliwell vd., 2000).



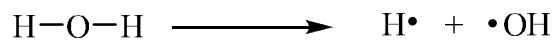
2.2.1.3. Hidroksil radikali (OH·)

Organizmada oluşan en reaktif ve hasar verici serbest radikaldir ve hidrojen peroksit tarafından oluşturulur. Yarı ömrü çok kısa olmasına rağmen yüksek aktif özelliğinden dolayı bulunduğu hücre bölümünden uzağa gitmeden, olduğu yerde hemen reaksiyona girer ve hücresel elemanlara büyük zarar verir (Akkuş, 1995, Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Hidroksil radikali, çoğunluğu radikal olmayan biyolojik moleküllerle zincir reaksiyonları başlatabilir ve DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek hasar oluşturabilir.

Biyolojik şartlarda hidroksil radikali aşağıdaki yollarla oluşabilir:

a) İyonlaştırıcı radyasyonun su molekülüne etkisiyle

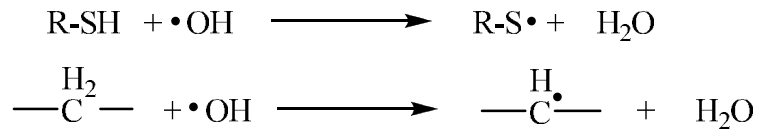


b) Geçiş metalleri varlığında Fenton, süperoksit varlığında da Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidroksil radikali oluşur.

c) Ozona (O₃)elektron transferiyle hidroksil radikali oluşabilir.

d) Hidrojen peroksitin fotolizi ile oluşur.

e) Radikal reaksiyonu sonucu oluşan organik radikal ile H₂O₂ tepkimeye girerek hidroksil oluşturulabilir.



Biyolojik sistemdeki bu güçlü radikal hemen hemen tüm makromoleküllerle reaksiyon verebilir. Fakat öncelikli hedefi elektronca bol bileşiklerdir. Nükleik asit ve proteinlerle çeşitli tepkimeler verir.

2.2.1.4. Singlet oksijen (¹O₂)

Singlet oksijenin ortaklanmamış elektronu yoktur, radikal olmayan bir reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olduğu gibi, serbest radikal reaksiyonlarının sonucunda da meydana gelir. Oldukça reaktiftir.

Oksijen elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere iki çeşidi vardır (Akkuş, 2000). Delta formu, sigma formuna göre daha uzun ömürlüdür.

Singlet oksijen organizmada başlıca;

a) Pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla,

b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde,

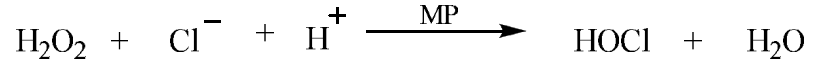
c) Dismutasyon tepkimeleri sırasında,

d) Prostoglandin endoperoksit sentaz, myelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında oluşabilir.

2.2.1.5. Hipoklorik asit (HOCl)

Hipoklorik asit dokularda hasara yol açan çok güçlü bir oksidandır. Bu yüzden radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasında yer almaktadır. HOCl fagositik hücreler tarafından bakterileri öldürmek amacıyla üretilir (Murray vd., 1996).

HOCl miyeloperoksidaz (MP) enzimi tarafından H₂O₂ ve Cl⁻ iyonunun oksidasyonu sonucu üretilir. HOCl'den çeşitli reaksiyonlar sonucu hidroksil radikali oluşabilir.



2.2.1.6. Nitrik oksit (NO•)

Nitrik oksit hücrel patofizyolojide çok önemli bir role sahip, suda çözünebilir bir serbest radikal gazıdır. Vazodilatör (damar genişletici) mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, santral ve periferel sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif rol alır, parazitlerin öldürmesinde kullanılır (Halliwell, 1994, Murray, 1996).

Nitrik oksit organizmada, L-arginin ve oksijenden nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla sentezlenir.

Hücrede ve hücre dışında taşınan NO• miktarı çok hassastır, çünkü az miktardaki NO• metabolizma için faydalıyken fazlası son derece tehlikelidir. Nitrikoksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu, güçlü ve toksik oksidan olan peroksinitrit radikali (ONOO⁻) oluşur. Peroksinitrit'in yıkım ürünleri ise lipid peroksidasyonu, enzim aktivitesinin azalması ve ateroskleroz gelişmesi gibi olaylara sebep olur (Türkyılmaz, 2007).

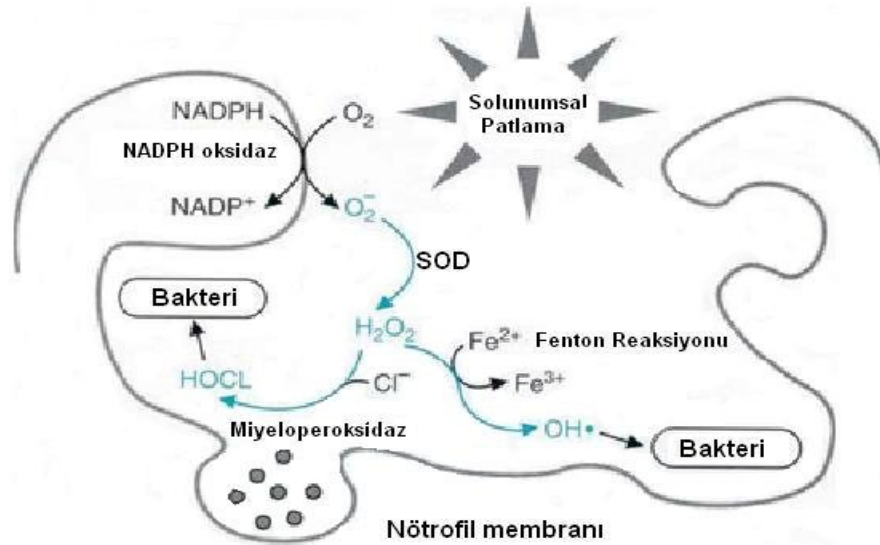
2.2.2. Organizmada reaktif oksijen türlerinin (ROT) kaynakları

Normal metabolik süreçte hücrede gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar sırasında, ara ürün olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Eğer bu serbest radikaller buradan sızar ve kazara moleküler oksijenle etkileşirse serbest oksijen radikalleri oluşur. Başlıca reaktif oksijen türü kaynakları; biyolojik ve hücre içi olmak üzere iki tanedir.

2.2.2.1. Biyolojik kaynaklar

Biyolojik kaynaklarda ROT oluşumu farklı şekillerde meydana gelir. Bunlar sırasıyla açıklanırsa;

-Solunumsal patlama: Organizmadaki enfeksiyonlara karşı ilk savunmayı oluşturur. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik lökositler, savunma amacıyla mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama gösterir. Bu patlama esnasında serbest radikaller oluşur. Fagosite edilmiş mikroorganizma solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülürken, oluşan oksidan ürünler hücrenin antioksidan savunma düzeyini aşarsa, normal konak hücelere de zarar verir ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynar (Url 4). Şekil 2.2’de bu durum gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri (Url 4)

-Antikarsinojenik ilaçların hasta hücre üzerine etkisi sırasında gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller oluşur.

-Radyasyon ve hava kirliliği, pestisitler, sigara dumanı, çözücüler ve aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel etkenler serbest radikal oluşumuna sebep olur.

-Alkol ve uyuşturucu gibi bağımlılık yapan maddeler serbest radikal artışına sebep olur.

-Stres: Stres durumunda vücutta katekolamin artışı olur. Katekolaminlerin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir (Akkuş, 2000).

2.2.2.2. Hücreiçi kaynaklar

Hücre içi kaynaklarda da ROT'ların oluşum yolları çeşitlidir:

-Genelde, solunum zinciri dediğimiz mitokondriyal elektron transport zincirinde olan sızıntı, hücredeki en büyük serbest oksijen radikali kaynağıdır.

-Toksik maddeler ile; Kendisi serbest radikal olan toksinler, serbest radikale dönüşen toksinler, metabolizması sonucu serbest radikal meydana getiren toksinler ve antioksidan aktiviteyi düşüren toksinler sebebiyle organizmada serbest radikal miktarı artabilir.

-Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi ile; membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır (Url 2).

-Hayvan hücrelerinde; askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu yoluyla; süperoksit radikalinin oluşur.

-Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, aminoasit oksidaz gibi enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlar esnasında; hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşur.

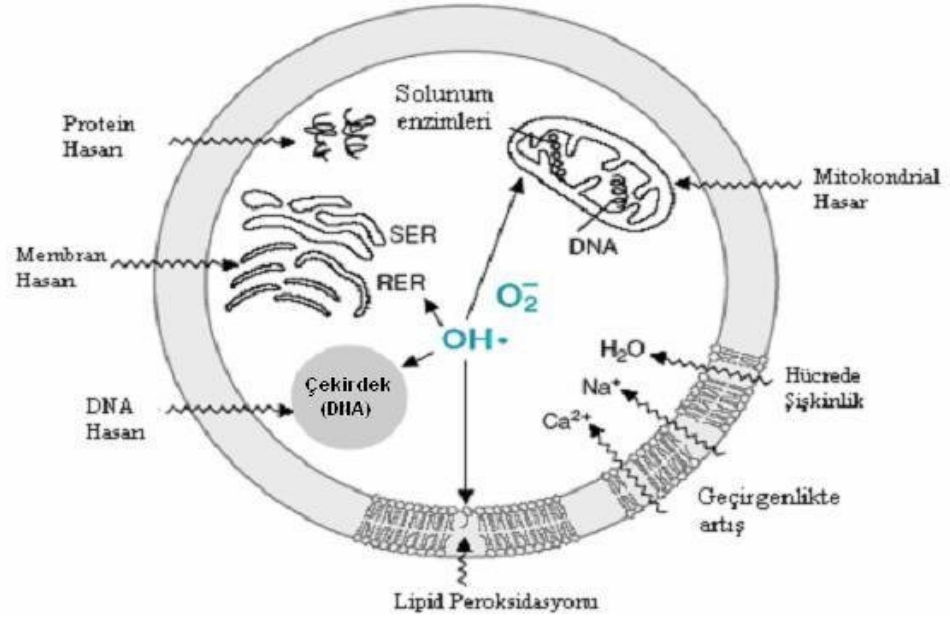
-Özellikle demir ve bakır olmak üzere geçiş metalleri, oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar. Bu sebeple geçiş metalleri, serbest radikal reaksiyonları için bir katalizör gibi iş görür. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ 'den $OH\cdot$ radikali oluşumunu katalizler.

-Reaktif oksijen türlerinin bir diğer önemli kaynağı ise 20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asidi olan araşidonik asit metabolizmasıdır. Fagositik hücrelerin uyarılmasıyla fosfolipaz ve proteinkinaz aktivite olur ve araşidonik asidin plazma membranında serbestleşmesine neden olur. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonunda ara ürün olarak çeşitli serbest radikaller meydana gelir. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu” denir (Akkuş, 2000).

2.2.3. Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri

Enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, aşırı oksijen basıncı, ozon, azotdioksit, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi çeşitli çevresel faktörler sebebiyle metabolizmadaki serbest radikal üretiminde artış olur.

Meydana gelen serbest radikalin fazlası, hücrenin savunma sistemi tarafından yok edilmediğinde serbest radikaller diğer moleküllerle reaksiyona girerek bir zincir reaksiyonu başlatırlar. Bu reaksiyonun sonunda yeni serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller güçlü reaktivitelerinden dolayı hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli bileşiklerine etki eder. (Url 4). Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri Şekil 2.3'te şema halinde verilmiştir.



Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat vd., 2002)

Özetle serbest radikallerin hücre ve dokularda neden olduğu zararlar;

- DNA tahribatı,
- Nükleotid yapıli koenzimlerin yıkımı,
- Hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değışmesi,
- Enzim aktiviteleri ve lipid metabolizmasındaki değışikler,
- Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- Protein tahribatı,
- Lipid peroksidasyonu sonucu zarın yapı ve fonksiyonunun değışmesi,
- Zar proteinlerinin tahribatı ve taşıma sisteminin bozulması,
- Steroid ve yaş pigment denilen bazı maddelerin birikimi,
- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerde oksidasyon-redüksiyon

olaylarının bozulmasıdır.

2.2.3.1. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

DNA ve nükleik asitler serbest radikallerden çok kolay etkilenirler. İyonize edici radyasyonla meydana gelen serbest radikaller, hücrede mutasyon ve ölüme sebep olur.

Singlet oksijen ve özellikle hidroksil radikali, deoksiriboz ve diğer bazlarla reaksiyona girerek, tek ve çift zincir kırılmalarına, baz dizilim değişikliklerine ve baz eksilmelerine neden olabilir. Özellikle nötrofil kaynaklı hidrojen peroksit, membranlarda kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşabilir ve ortamdaki metal iyonları ile etkileşerek hidroksil radikali oluşturabilir. Hidroksil radikali nükleik asitlerdeki doymuş karbon atomlarından hidrojen atomu çıkarılması veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan süreçlerde rol alır. Bütün bunlar hücrede mutagenез, karsinogenез, hücre disfonksiyonu veya ölüme yol açar (Halliwell, 1994).

2.2.3.2. Serbest radikallerin lipidlere etkisi

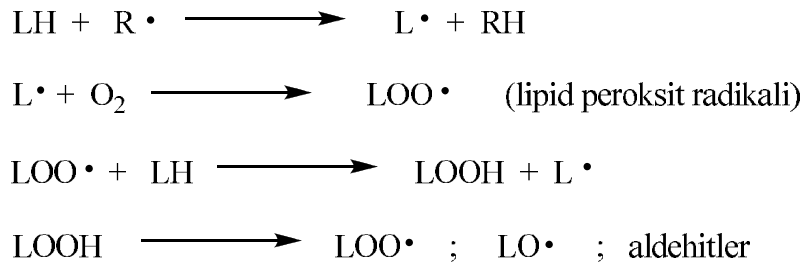
Serbest radikaller tüm biyomoleküllerde tahribat yaratır, fakat serbest radikallerden en çok etkilenen biyomoleküller lipidlerdir. Hücre membranının yapısında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, peroksidasyon ürünleri oluşturur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı "lipid peroksidasyonu" olarak bilinir ve çok zararlıdır. Lipid peroksidasyonunun zararı kendi kendini devam ettiren zincir şeklinde ilerlemesinden kaynaklanmaktadır. Bu reaksiyonun gerçekleştirdiği hasarın geri dönüşü yoktur.

Serbest radikalın yağ asidinden bir hidrojen atomu koparmasıyla başlayan peroksidasyon reaksiyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Bu reaksiyonda en etkili serbest radikalın hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir.

Bir hidrojenini kaybeden yağ asidi, lipid radikali (L·) niteliği kazanır. Lipid radikali kararsızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül kendi içinde bir düzenleme

gerçekleştirir ve konjuge dienler oluşur. Konjuge dienler moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini ($\text{LOO}\cdot$) oluşturur. Bu radikaller membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşime girerek, yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar, bu sırada kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine dönüşür. Reaksiyon bu şekilde kendini katalizleyerek ve tekrarlayarak devam eder (Url 4).

Reaksiyon, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu aldehitler biyolojik olarak çok aktiftir, ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da hücrenin başka bir bölgesine diffüze olup tahribat yaratırlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterdiği için lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır.



Lipid peroksidasyonu çok zararlı reaksiyondur. Direkt olarak membran yapısına, reaktif aldehitler üreterek de diğer hücrelere zarar verir. Birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Hücre membranının geçirgenliği ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Malondialdehitin gerçekleştirdiği bazı reaksiyonlar hücrede deformasyona ve enzim aktivitesinin değişmesine sebep olur. Lipid peroksidasyonunun neden olduğu hasar dönüşümsüzdür (Onat vd., 2002).

2.2.3.3. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler, serbest radikallerden çoklu doymamış yağ asitlerine göre daha az etkilenirler ve zincir reaksiyonun hızla ilerleme ihtimali daha düşüktür. Doymamış bağ ve kükürt içeren proteinlerin serbest radikallerle etkileşimi içerdiği aminoasitlere bağlıdır. Triptofon, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi çift bağlı ya da kükürtlü aminoasit içeren proteinler, serbest radikallerle daha kolay tepkimeye girerler, kükürt radikalleri veya karbon merkezli radikaller oluştururlar (Van Der Vliet vd, 1994).

Bu reaksiyonlar sonucu immünglobülin G ve albumin gibi çok sayıda kükürt içeren proteinlerin 3 boyutlu yapıları bozulur ve fonksiyonlarını yerine getiremez hale gelirler.

HEM proteinleri de serbest radikallerden önemli ölçüde zarar görür. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- veya H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu methemoglobin meydana gelir (Akkuş, 2000).

2.2.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

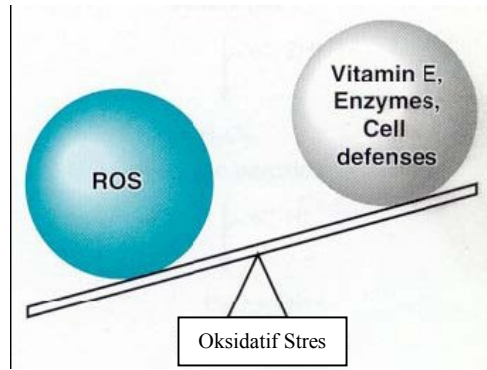
Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle meydana gelen ürünler çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynar. Bu ürünler monosakkaridlerin otooksidasyonu ve sigara içimiyle bağlantılı kronik hastalıklar gibi patolojik süreçlerde önemli rol alır.

Okzaldehytler, karbonhidratlara DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma yeteneğini kazandırır. Bu özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterir, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asit, sinoviyal sıvıda da çok bulunur ve enflamatuar eklem hastalıklarında oluşan ROT'larca parçalanır. Aynı durum gözde katarakt oluşumuna neden olur (Akkuş , 2000).

2.3. Oksidatif Stres

Organizmadaki normal metabolik reaksiyonlar esnasında sürekli bir serbest radikal üretimi vardır. Bazen bu serbest radikaller sızma yapar ve tesadüfen oksijenle etkileşerek reaktif oksijen türlerini oluştururlar. Meydana gelen ROT'lar antioksidan savunma sistemleri tarafından bertaraf edilirler, fakat bazen savunma sistemlerinin ortadan kaldırılabileceğinden fazla ROT meydana gelir. Bu durum “oksidatif stres”e yol açar. Oksidatif stres “organizmadaki oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar yönüne kayarak, hücre hasarına yol açması” şeklinde tanımlanır (Halliwell,1994).



Şekil 2.4. Oksidatif stres durumu (Url 4)

Oksidatif stresin, reaktif oksijen türlerinin gerçekleştirdiği hücre hasarı sonucu; iskemi, reperfüzyon, ateroskleroz, yaşlanma, diabetes mellitus, çeşitli kanser türleri, romatoid artrit, Alzheimer ve katarakt gibi birçok hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu sebeple oksidatif stres alanındaki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

Birçok hastalıkta serbest radikal üretimin arttığı ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Bu serbest radikal hastalıkları üç grupta toplanabilir:

1. Genetiğe bağlı (Fanconi anemisi, bloom sendromu)
2. Çevresel bileşenler (iş hastalıkları, zehirlenmeler, virüs ve bakteriyel enfeksiyonlar)

3. Hem genetik hem de çevresel (bronşial astım, diabetes mellitus, kanser, kardiovasküler hastalıklar ve diğerleri)

Ancak serbest radikallerin hastalıklar üzerindeki rolü incelenirken, serbest radikallerin hastalığın sebebi mi, yoksa sonucu mu olduğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla birçok savunma mekanizması vardır. Bunlara “antioksidan savunma sistemleri” ya da kısaca ”antioksidanlar” denir. Bu bileşikler; lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi hedef moleküllerdeki hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini tutarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar “endojen antioksidanlar” ve “eksojen antioksidanlar” diye iki temel sınıfa ayrılır. Enzimler, yağda ve suda çözünen radikal tutucuların bazıları ve metal iyonlarını bağlayan proteinler endojen antioksidanlardır. İlaçlar, vitaminler ve gıdalarla alınanlar ise eksojen antioksidanlardır (Türkyılmaz, 2007).

2.4.1. Antioksidanların etki tipleri

Antioksidanlar; reaktif oksijen türlerini daha az toksik ürünlere dönüştürürler, ROT’ları yakalayıp nötralize ederler veya radikal oluşmasını önlerler veya oluşan radikalın yayılmasını engellerler. Bunları yaparken dört ayrı tipte etki ederler (Türkyılmaz, 2007):

a) Toplayıcı etki (scavenging effect)

- b) Bastırıcı etki (quencher effect)
- c) Zincir kırıcı etki (chain breaking effect)
- d) Onarıcı etki (repair effect)

a) Toplayıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etkidir**. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

b) Bastırıcı Etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı etkidir**. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

c) Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı etkidir**. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

d) Onarıcı Etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etkidir**. Hücredeki çeşitli enzimatik tamir mekanizmaları onarıcı etki gösterir (Akkuş, 2000).

2.4.2. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar çeşitli şekilde sınıflandırılabilirler. Başlıca sınıflandırma şekli endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olarak sınıflandırılmasıdır. Bunun haricinde serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler ya da enzimler veya enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilir. Fakat endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar şeklindeki sınıflandırma hepsini kapsamaktadır (Akkuş, 2000).

2.4.2.1. Endojen antioksidanlar

Organizmada doğal olarak bulunan antioksidanlardır. Enzim olanlar ve suda veya yağda çözünen radikal tutucular, hormonlar gibi enzim olmayanlar şeklinde ikiye ayrılır.

2.4.2.1.1. Enzimler

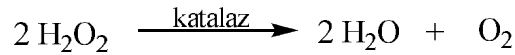
Süperoksit Dismutaz (SOD): SOD, serbest radikallerin organizmada ilk karşılaştıkları enzimdir. Süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Halliwell, 1994).



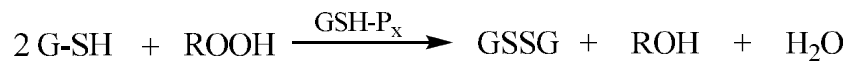
Fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korumaktır. Fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde de rol oynayan SOD, H_2O_2 ürettiği için H_2O_2 uzaklaştırıcı enzimlerle birlikte çalışır.

Katalaz (CAT): Bulunduğu hücre tipine göre konsantrasyonu değişen katalaz yapısında 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir (Murray vd., 1996).

Hidrojen peroksitin, su ve oksijene yıkılımını katalizler.

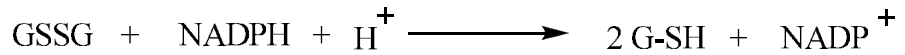


Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Hücrede bulunan hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan asıl sorumlu olan enzimdir. Lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engeller. Selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki çeşidi vardır.



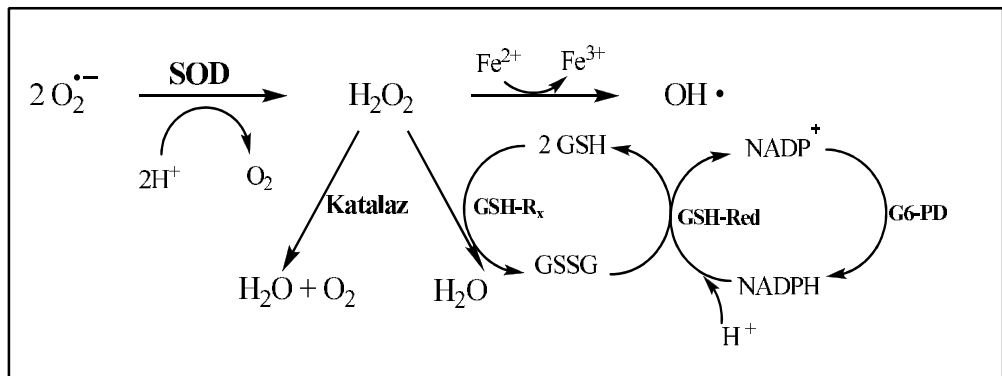
Reaksiyonlar sonucunda oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oluşur. Aktivite gösterebilmesi için yeniden indirgenmiş şekline dönmelidir, aksi halde GSSG artışı oksidatif stresi işaret eder (Seven ve Candan, 1996).

Glutatyon Redüktaz (GSH-Red): Sitozol ve mitokondride bulunur. GSH-Px'in katalizlediği, hidroperoksitlerin indirgenmesi sırasında oluşan okside glutatyon (GSSG) NADPH varlığında tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder.



Glutatyon S-Transferazlar (GST): Her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Yabancı maddelerin dönüşümü veya detoksifikasyonu gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir.

GST antioksidan olarak, araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri gibi lipid peroksitlerine karşı selenyum–bağımsız GSH-Px aktivitesini gösterir (Akkuş, 1995).



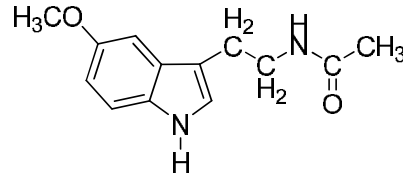
Şekil 2.5. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları (Url 4)

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder.

2.4.2.1.2. Enzim olmayanlar

Melatonin: Uyku, üreme, aydınlık-karanlık döngüsünün düzenlenmesi gibi çok sayıda biyolojik fonksiyonu olan melatonin hormonu hem suda hem yağda çözünebilen, geniş bir aktivite alanına sahip çok güçlü bir antioksidandır.

Hidroksil, hidrojen peroksit, süperoksit, nitrik oksit gibi serbest radikalleri detoksifiye eder (Yazıcı ve Köse, 2004).



Melatonin

Bilirubin: Suda çözünebilen bilirubin, HEM metabolizmasının son ürünlerinden biridir. Organizma için önemli bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikalini toplar, lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Seven ve Candan, 1996).

Glutatyon: Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bu tripeptit, suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasardan korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünü engeller.

Ürik Asit: Süperoksit, peroksit radikalleri, hidroksil ve singlet oksijeni giderirken, lipid radikalleri üzerinde etkisi yoktur (Akkuş, 1994).

Metal iyonlarını bağlayan proteinler: Geçiş metalleri oksidatif hasarı dolaylı olarak hızlandırır, bu nedenle proteinlerce bağlanmalıdırlar.

Ferritin dokudaki, Laktoferrin ve transferin ise dolaşımdaki demiri bağlar. Albümin hem bakırı bağlar hem de HOCl ve lipid peroksitlerinin giderilmesinde etkilidir. Seruloplazmin ise plazmadaki bakırı bağlar, ayrıca Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e

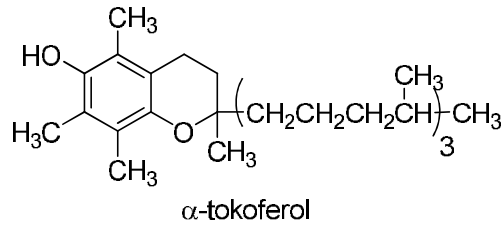
yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve dolayısıyla hidroksil readikali oluşumunu inhibe eder (Url 4).

2.4.2.2. Eksojen antioksidanlar

Metabolizmada doğal olarak üretilmeyen bu antioksidanlar vitaminler, ilaçlar ve gıdalardaki antioksidanlar olmak üzere üç gruba ayrılabilir.

2.4.2.2.1. Vitaminler

α -tokoferol (E Vitamini): Yağda çözünen bir madde olan α -tokoferol E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerden koruyan ilk savunma hattıdır. Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka, aktif bölgesini oluşturur ve antioksidan aktivite göstermesini sağlar.

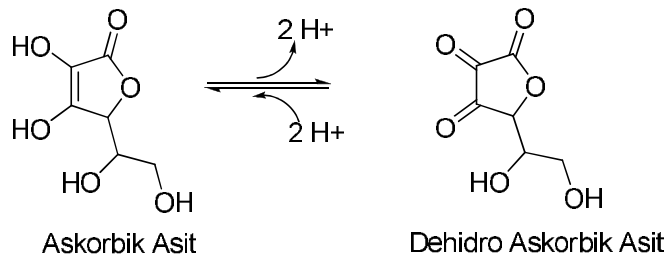


Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Zincir kırıcı bir antioksidandır ve lipid peroksidasyon reaksiyonunu sonlandırabilir.

Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenerek doğal şekline dönüşür.

α -tokoferol ve glutatyon peroksidazın serbest radikaller üzerinde birbirini tamamlayıcı etkisi vardır. Glutatyon peroksidaz meydana gelmiş peroksitleri giderirken, vitamin E peroksit oluşumunu engeller (Seven ve Candan, 1996, Akkuş, 1993).

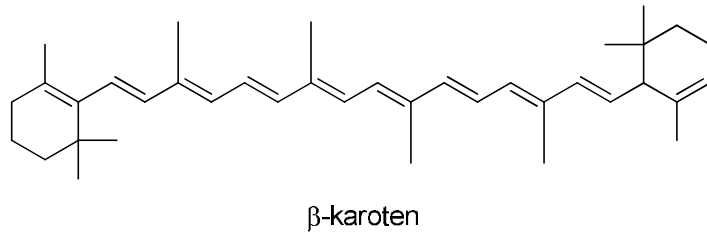
Askorbik Asit (Vitamin C): Suda çözünebilir bir vitamin olan askorbik asit, özellikle yeşil sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. Kolayca bozunabilen bir bileşiktir. Organizmada birçok bileşik için indirgeyici görevi görür. Güçlü bir indirgeyici olduğu için güçlü bir antioksidandır.



Askorbik asit; hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil, hipoklorit, peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutar. Peroksidasyonunun başlamasını engeller. α -tokoferolün yeniden indirgenmesinde görevlidir.

Askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterirken, düşük konsantrasyonlarda prooksidan aktivite gösterebilir, demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunu başlatabilir. Fakat bu çok nadir rastlanan bir durumdur (Akkuş, 1995, Halliwell, 1994).

Karotenoidler: Bitkilerde yaygın olarak bulunup, yağda çözünebilir bu bileşikler doğal renk pigmentleridir. En bilineni A vitamini öncüsü olan β -karotendir.



β -karoten; singlet oksijen başta olmak üzere peroksit radikalleri ve süperoksit radikallerini giderir. Reaktif azot türlerini gidermede Vitamin E ve vitamin C ile sinerjik etki gösterir (Akkuş, 2000).

2.4.2.2.2. İlaçlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler), Rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (Vitamin E analogu) gibi antioksidanlar ilaç olarak kullanılırlar. Bunlardan başka, GSH-Px aktivitesini arttıran Ebselen ve başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive eden sitokinler, endojen antioksidanları aktive eden ilaçlar sınıfındadır. Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan probukol'un lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır. Albümin ve mannitol gibi nonenzimatik radikal toplayıcılar, hidroksil radikale karşı aktivite gösterirler. Demir şelatörleri, serbest demiri bağlayarak Fenton reaksiyonunu ve dolayısıyla hidroksil radikali oluşumunu engeller. Bir demir redoks döngüsü inhibitörü olan desferroksomin ise serbest Fe^{3+} 'i bağlar (www.mustafaltinisik.org).

2.4.2.2.3. Gıdalardaki antioksidanlar

Organizmada doğal olarak bulunan antioksidanların yanında beslenmemizde gıdalardan aldığımız antioksidanlar maddeler de vardır. Antioksidan bileşikler gıdalarda ya doğal olarak ya da sentetik antioksidanların gıda katkı maddesi olarak eklenmesiyle bulunur.

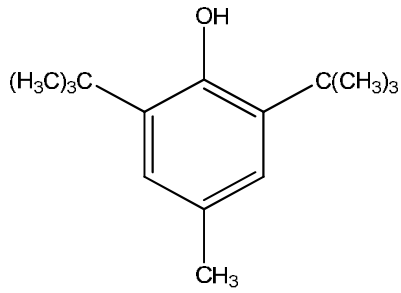
Tükettiğimiz taze sebze ve meyvelerin bizi çeşitli hastalıklardan koruduğu bilinmektedir. Bu koruyuculuk; askorbik asit, α -tokoferol, β -karotenoidler, glutatyon,

fitosteroller, kumarinler, flavonoidler ve likopen gibi antioksidan özellik gösteren bileşikler sebebiyle gerçekleşmektedir.

Likopen: Karotenoidler arasında en güçlü singlet oksijen (1O_2) tutucudur. Likopen birçok sebze ve meyveye kırmızı rengi veren maddedir.

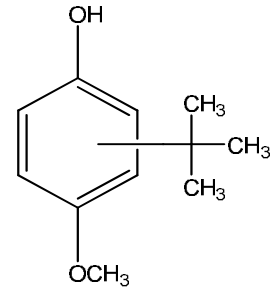
Flavonoidler: Bitkilerin sarı-beyaz pigmenti olan flavonoidler polifenolik bileşiklerdir. Halka yapılarına göre flavanoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyoninler, kateşinler ve izoflavonoidler şeklinde sınıflandırılırlar (Bilaloğlu ve Harmandar, 2000). Antioksidan etkinlikleri, içerdikleri $-OH$ grubu sayısı ile orantılıdır. Süperoksit, lipid alkoksil, lipid peroksil ve nitrik oksit radikallerinin giderilmesinde, Fe ve Cu şelatlama gibi reaksiyonlarda etkinlik gösterirler (Miller ve Ruiz-Larrea, 2002).

Gıdalara sentetik antioksidanların eklenmesinin sebebi ise; gıdaların korunmasıdır (Finley ve Given, 1986). Bu amaçla gıdalara bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), propil gallatlar (PG), tert-bütül hidrosikininon (TBHQ), sodyum benzoat gibi sentetik antioksidanlar eklenir.



BHT

(3,5-di-tert bütül-4-hidroksitoluen)



BHA

(tert-bütül-4-metoksifenol)

Bu sentetik antioksidanlar gıdalara; lipid peroksidasyonunu engellemek veya azaltmak, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engellemek, besin kalitesini sürdürmek, raf ömrünü uzatmak amacıyla eklenir.

2.5.Tükettiğimiz Besinler ve Antioksidanlar

Gıdalarla alınan antioksidanların, insan sağlığı ve yaşam kalitesi üzerindeki olumlu etkisi anlaşıldığından beri gerek halkın, gerek uzmanların bu konudaki ilgi ve merakı sebebiyle tüketilen gıdaların antioksidan kapasitesi üzerindeki araştırmalar artış göstermiştir.

Bu çalışmalarda bildirildiği üzere; yapılan 200'ün üzerindeki araştırmada taze meyve ve sebze tüketiminin akciğer, pankreas, mide, yemek borusu, gırtlak, yutak, kolon kanserlerinde koruyucu etki gösterdiği görülmüştür. Bu sebze ve meyveler arasında öne çıkanlar; soğan, sarımsak, pırasa, havuç, brokoli, brüksel lahanası, lahana, karnabahar ve domatestir. Başka bir çalışmada ise yüksek likopen içeriği sebebiyle domatesin kanserle ilişkisi incelenmiştir (İşbilir, 2008).

Bunlar haricinde yine üzüm, nar, elma, üzüksü meyveler, adaçayı, biberiye, kekik, brokoli, domates, soğan, sarımsak, havuç, ıspanak, karnabahar, lahana, kereviz, çay, yeşil çay, şarap, siyah üzüm suyu gibi çeşitli meyve, sebze ve içeceklerde yapılan incelemeler sonucunda özellikle flavonoid ağırlıklı olarak içerdikleri fitonutrientlerin antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu görülmüştür. Baharatlar bitki sınıfları içinde antioksidan özellikleri en çok kabul edilmiş sınıftır. Birçoğunun antioksidan özellik gösteren bileşikleri izole edilmiştir. Biberiye, adaçayı, kekik, mercankökü, zencefil ekstraktlarının mısır, balık, zeytin, fındık, ayçiçeği, soya yağları üzerindeki oksidasyon stabilitesi incelenmiş ve etkili olduğu bildirilmiştir (İşbilir, 2008).

Doğal ve bitkisel kaynaklarda yeni antioksidan arayışı devam etmektedir. Bu kaynakların ucuz, yenilebilir ve bol bulunur olması önemlidir. Bu sebeple tarımsal ve endüstriyel atıklar dikkat çekmiş ve patates kabuğu atıkları, üzüm kabuğu, üzüm çekirdeği, zeytin küspesi, havuç pulpu atığı, yeşil çay yaprakları, soya fasulyesi melası, narenciye çekirdeği ve kabukları üzerinde çeşitli incelemeler yapılmış ve bazılarının polifenolik bileşikleri tanımlanmıştır.

Taze sebze ve meyvelerde bulunan doğal antioksidan maddelerin başta kanser olmak üzere, diyabet, obezite, katarakt ve kardiovasküler hastalıklar üzerinde koruyucu etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Bu sebeple vücudun endojen antioksidan savunma sisteminin, beslenme yoluyla alınan antioksidan bileşiklerle desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir (İşbilir, 2008).

Bu tez kapsamında, son yıllarda tanınmaya başlayan alabaş bitkisinin yapraklarının ve gövdesinin *in vitro* koşullarda antioksidan aktivitesi çeşitli metodlarla incelenmiş ve alabaş bitkisi beslenmemizde doğal bir antioksidan kaynağı olup olamayacağı yönünden değerlendirilmiştir.

2.5.1. Antioksidan aktivite tayin metodları

Gıdaların bileşiminin kompleks oluşu, gıda antioksidanlarının çoklu fonksiyon göstermesi ve sinerjistik etkileşimleri sebebiyle, gıda bileşenlerinin özel olarak ayrılması ve çalışılması pahalı ve zordur. Bu nedenle antioksidan aktivite bir bütün olarak incelenir. Aktivite ölçümü için çok çeşitli metodlar vardır, ancak fazla çeşit görüş ayrılıklarını da beraberinde getirmiştir. Ölçüm yapılırken farklı oksidasyon şartlarında farklı oksidasyon ürünlerini ölçmek için birden fazla metod kullanılmalıdır (Frankel ve Meyer, 2000).

Toplam antioksidan aktiviteyi ölçmek için geliştirilmiş çeşitli metodlardan bazıları;

- Trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC)
- Toplam radikal tutma parometresi (TRAP)
- Demir (III) iyonu indirgeme gücü (FRAP)
- Oksijen radikalini absorblama kapasitesi (ORAC)'dir (Frankel ve Meyer 2000).

Antioksidan aktivite tayin metodları, kimyasal reaksiyonlarına göre iki gruba ayrılırlar:

Birincisi; hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan metodlar ve ikincisi; bir tek elektron transferine (ET) dayanan metodlardır. Bu temellere dayanan metodların hedefi; koruyucu antioksidan kapasitesi yerine, oksidan giderici kapasiteyi ölçmektir. Tablo 2.2’de bu metodlar özetlenmiştir.

Tablo 2.2. In vitro koşullarda uygulanan antioksidan aktivite tayin metodları (İşbilir, 2008).

<p>HAT-temelli metodlar</p> $\text{ROO}\cdot + \text{AH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{A}\cdot$ $\text{ROO}\cdot + \text{LH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{L}\cdot$	<p>Oksijen radikalini absorblama kapasitesi (ORAC)</p> <p>Linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonu (TRAP)</p> <p>LDL oksidasyonunun inhibisyonu (TRAP)</p> <p>Crocine ağartma metodu</p>
<p>ET-temelli metodlar</p> $\text{M}^n + \text{e}^- (\text{AH'den}) \longrightarrow \text{AH}\cdot + \text{M}^{(n-1)}$	<p>Trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC)</p> <p>Fe(III) iyonu indirgeme gücü (FRAP)</p> <p>DPPH radikali giderme aktivitesi</p> <p>FCR ile toplam fenolik bileşik tayini</p>
<p>Diğer metodlar</p>	<p>Tiyobarbitürikasit ile oksidasyon ürünlerinin tayini (TBARS)</p> <p>Peroksit değeri (POV)</p> <p>Ransimat metodu</p> <p>Çeşitli serbest radikalleri yakalama metodları</p>

2.5.1.1. HAT-temelli metodlar

Temel olarak hidrojen atomu transferine dayanan bu metodlarda, ilk olarak bir radikal başlatıcı kullanılarak, peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$) üretilir. Reaksiyon ortamındaki antioksidan ve substrat, radikaller için yarışır. $\text{ROO}\cdot$ tercihen, antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuç olarak peroksil radikali ve hedef molekülün arasındaki reaksiyon geciktirilir veya inhibe edilir (Ou vd., 2002, Huong vd., 2005)

2.5.1.2. ET-temelli metodlar

Bu metodların temeli elektron transferine dayanır. Fe^{3+} , $\text{ABTS}^{\cdot+}$ gibi bir oksidanın antioksidanı yükseltmesiyle, antioksidandan oksidana bir elektron transferi gerçekleşir. Bu transfer oksidanın renginin değişmesine sebep olur. UV/VIS ile absorban değişimi ölçülür. Absorbanstaki değişim derecesi, antioksidan konsantrasyonuyla doğru orantılıdır ve antioksidan maddenin indirgeyici kapasitesinin tayininde kullanılır (Huong vd. 2005).

2.5.1.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar

Lipid oksidasyonu ölçümleri için en çok kullanılan indikatörler; reaksiyon ortamındaki oksijen, yağ asitleri gibi reaktanların kaybı, hidroperoksitler, aldehitler, ketonlar, asitler gibi primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumunun tayin edilmesidir. Bu amaçla en çok kullanılan metodlar; peroksit değeri (POV), tiyobarbitirik asit reaktif türlerinin (TBARS) tayini ve kısa zincirli yağ asitlerinden kaynaklanan iletkenliğin (Ransimat) ölçümüdür (Pon vd., 2007).

2.5.1.4. Diğer ROT giderici kapasiteleri ölçen metodlar

İnsan vücudunda üretilen reaktif oksijen türlerinden $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ ve ONOO^- 'ı gidermek için herhangi bir enzimatik faaliyet bilinmemektedir. Bu sebepler oksidan giderici kapasiteleri ölçülen örneklerde uygulanan metodun reaktif oksijen türlerini de içermesi gerekmektedir. In vitro koşullarda çeşitli radikal üretici sistemler kullanılarak antioksidanların serbest radikal tuzaklama yetenekleri ölçülür. Bu ölçüm için kullanılan metodlar; O_2^- radikali giderme kapasitesi tayini, $\cdot\text{OH}$ radikali giderme kapasitesi tayini ve peroksinitrit (ONOO^-) giderici kapasitenin tayinidir.

2.6. Alabaş (*Brassica oleracea* var. *Gongylodes*)

Brassicaceae ailesinden olan alabaş, toprak üzerinde oluşan şişkin gövdesi ile sebze olarak tüketilmektedir. Lahana grubu sebzelerden olan alabaşı, lahana grubu sebzelerden ayıran özelliği, sebze olarak değerlendirilen gövdesinin depo haline gelmesidir (Url 1).

Şekil 2.6'da görüldüğü gibi, alabaşta gövdenin rengi açık yeşil veya maviye çalan eflatun olabilir. Yapraklar yumrunun üst kısmından çıkar. Yaprak sapları diğer lahana grubu sebzelerinden uzun olsa da yaprak ayası daha küçüktür. Çiçeklenme ve meyve özellikleri ise diğerleriyle aynıdır (Url 5).



Şekil 2.6. Alabaş Bitkisi

Alabaş her toprakta yetişebilir ama optimum 22° C sıcaklık ister. Ülkemizde Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Fakat üretim alanı ve miktarı çok düşük olduğundan ekonomik anlamda üretilip tüketilmektedir. Türkiye'de tüketimi çok olmasa da İngiltere, Almanya, Belçika, ve Hollanda'da bolca tüketilmektedir. Anavatanının Batı Avrupa ülkeleri olduğu düşünülmektedir (Eşiyok., 2005).

İçerisinde bulundurduğu β -karoten, folik asit, C vitamini, A vitamini gibi maddelerle astım, kanser, katarakt, yüksek tansiyon ve sinir sistemi hastalıklarında etkili olduğu düşünülmektedir (Halk Gazetesi, 2006).

Zengin C vitamini ve potasyum içeriği, az kalorili, bol lifli yapısı ile diyetle önemli olduğu düşünülen alabaşın, üreticiler için alternatif bir geçim kaynağı olabileceği de zannedilmektedir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Örneği

Deneylerde kullanılan alabaş (*Brassica oleracea var. Gongylodes*) bitkisinin tohumları T.Ü. Havsa Meslek Yüksek Okulu Seracılık Programı'nın serasına ekilerek yetiştirildi. Temizlenen gövde ve yapraklar taze haliyle kullanıldı.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma, Merck, Aldrich ve Riedel de Haen firmalarından satın alınmıştır.

Deneylerde; rondo (Tefal 400W), analitik terazi (Gec Avery), çalkalamalı su banyosu (Clifton termostatlı 100-400 rpm), rotary-evaporatör (Buchi R-200), inkübatör (EnoLab MB-80), vortex (Fisons), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), pH metre (WTW pH 330i), liyofilizatör (Armfield FT 33), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31) dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Folin-Ciocalteu Reaktifi: Firmadan satın alındığı şekilde kullanıldı.

% 2'lik Na₂CO₃: 2 gr Na₂CO₃ tartılıp destile suda çözüldü ve destile su ile balon jøjede 100 ml'ye tamamlandı.

1 mM DPPH: 0,01972 gr DPPH tartılarak etanolde çözüldü ve balon jojede etanolle 50 ml'ye tamamlandı.

0,1 mM DPPH: 1mM'lık DPPH çözeltilisinden 25 ml alınarak balon jojede etanolle 250 ml'ye tamamlandı.

0,2 M Fosfat Tamponu (pH=6,6): 13,609 gr $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ve 17,80 gr $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ tartılıp destile suda çözüldü ve her ikisi de ayrı ayrı 500 ml'ye tamamlandı. Bu iki çözelti pH=6.6 olacak şekilde karıştırılarak, tampon hazırlandı

% 1 $K_3Fe(CN)_6$: 1 gr $K_3Fe(CN)_6$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 ml'ye tamamlandı.

% 10'lik TCA: 10 gr TCA tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 ml'ye tamamlandı.

% 1'lik $FeCl_3$: 1 gr $FeCl_3$ tartılarak destile suda çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu: 1,9337 gr Tris tartılıp destile suda çözüldü. pH=8 olana kadar 1 M'lık HCl çözeltisi eklendi. pH=8 olunca destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

1 M'lık HCl: 4,13 ml % 37'lik HCl alınarak destile su ile balon jojede 50 ml'ye tamamlandı.

156 μ M NBT çözeltisi: 0,0255 gr NBT tartılarak Tris-HCl tamponunda çözüldü ve balon jojede 200 ml'ye tamamlandı.

468 μ M NADH çözeltisi: 0,0694 gr NADH tartılarak Tris-HCl tamponunda çözüldü ve balon jojede 200 ml'ye tamamlandı.

60 µM PMS: 0,0018 gr PMS tartılarak Tris-HCl tamponunda çözüldü ve balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.

2 mM FeCl₂: 0,0254 gr FeCl₂ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.

5 mM Ferrozin: 0,12 gr Ferrozin tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 50 ml'ye tamamlandı.

β-Karoten çözeltisi: 1 mg β-Karoten tartıldı ve 4 ml kloroformda çözüldü.

3.2. Metod

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanması

Taze alabaş bitkisinin gövde ve yaprakları rondoda ayrı ayrı öğütüldükten sonra etanol, metanol, aseton ve su ekstratları elde edildi.

Etanol, metanol ve aseton ekstratları için gövde ve yaprak örneklerinden 50'şer gr tartılarak, 500 ml etanol, metanol ve asetonla ayrı ayrı ekstrakte edildi. Ekstraksiyonların her biri 30° C'de 400 rpm'de ve 200 ml, 200 ml, 100 ml olmak üzere 3 aşamalı olarak toplamda 5 saatte gerçekleştirildi. Süzgeç kağıdından süzülme ve çözücülerini evaporatörde 40° C'de uçuruldu.

Su ekstratları için gövde ve yaprak örneklerinden 15'er gr tartılarak üzerine 150 ml kaynayan su eklendi, 15 dk boyunca manyetik balıkla karıştırılarak ekstraksiyon yapıldı. Ekstraktlar süzgeç kağıdından süzülme ve süzümte liyofilize edildi.

Bitki ekstratlarının verim hesabı için tartımları alındı ve karanlıkta +4° C'de saklandı.

Deneyleerde çalışılan konsantrasyonları hazırlamak üzere; bitki ekstraktları destile su ile 1000 mg/ml olacak şekilde özöldü. Daha dűřük konsantrasyonlu numuneler ise, bu stok çözeltiden seyrettilerek kullanıldı.

3.2.2. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini

Alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi (Singleton ve Rassi 1965). Folin-Ciocalteu Reaktifi fosfotungistik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımıdır ve bu asitler fenol oksidasyonu esnasında mavi renkli bileşiklere indirgenir. Renk değişimi polifenolik bileşiklerin miktarı ile orantılıdır. Yüksek absorbans, yüksek polifenolik bileşik içeriğini gösterir. Polifenolik miktarı genellikle gallik asit veya kateşol ekivalenti olarak ifade edilir.

100, 250, 500, 750 ve 1000 μ g/ml konsantrasyonlarında hazırlanan alabaş gövde ve yaprak ekstraktları ve gallik asit çözeltilerinden 0,1 ml alındı ve hacimler destile su ile 4,6 ml'ye tamamlandı. Üzerine 0,1 ml FCR katıldı. 3 dakika bekletildikten sonra 0,3 ml % 2'lik Na_2CO_3 özeltisi eklenerek 2 saat boyunca oda koşullarında, alkamalı su banyosunda 250 rpm'de tutuldu. 2 saat sonunda 760 nm'de absorbanslar okundu. Kör deneme örnek yerine destile su ile hazırlandı.

Gallik asit için çizilen absorbans-konsantrasyon standart grafiğinin denkleminde, örneklerin toplam fenolik madde miktarları μ g gallik asit (μ g GAE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesinin deneyi 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre yapıldı (Blois, 1958). Metod; bitki ekstraktlarının, bir proton veya elektron vererek mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımındaki absorbans düşmesi, yüksek serbest radikal giderme aktivitesini gösterir.

100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml olarak hazırlanan alabaş gövde ve yaprak ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 ml'sine, etanolde çözünmüş 0,1 mM DPPH çözeltisinden 4 ml eklendi ve vortekslendi. Karanlıkta ve oda koşullarında 30 dk. bekletildikten sonra absorbansları ölçüldü. Kontrol numunesi; örnek yerine 1 ml etanol ile çalışıldı.

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

Yukarıdaki formülle % aktivite hesaplandıktan sonra % aktivite-konsantrasyon grafiği çizildi, grafik yardımıyla DPPH'in % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstrakt ve standart madde konsantrasyonu olan EC₅₀ değeri bulundu ve sonuçlar EC₅₀=µg/mg olarak verildi.

3.2.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi (Dinis vd., 1994). Bu yöntem Fe²⁺ iyonlarını bağlamak için, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Örneğin şelatlama gücü ne kadar yüksekse kırmızı renkli Fe²⁺/ferrozin kompleksinin oluşumu o derece engellenir.

100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan alabaş gövde ve yaprak ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 ml'sine 3,7 ml deiyonize su ve 100 µl 2 mM FeCl₂ çözeltisi eklendi. Oda koşullarında 30 dk'lık inkübasyonun ardından 200 µl 5 mM ferrozin çözeltisi eklenerek vortekslendi. 10 dk daha bekletildikten sonra 562 nm'de absorbans ölçüldü. Kör deneme örnek yerine deiyonize su kullanılarak yapıldı.

% şelatlama aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Şelatlama Aktivitesi} = 1 - \frac{562 \text{ nmde Örnek Absorbansı}}{562 \text{ nmde Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

3.2.5. β-Karoten Ağartma Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Toplam antioksidan aktivite, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β-karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem, inhibisyon sonucu β-karotenin renginin açılması esasına dayanır. Yükselen absorbans değeri % antioksidan aktivite ile doğru orantılıdır.

1 mg β-karoten 4 ml kloroformda çözüldü. Bu çözeltinin 1 ml'si alınarak üzerine 200 ml Tween 40 ve 20 µl linoleik asit eklenip karıştırıldı. Kloroform vakum altında reaksiyon ortamından uzaklaştırıldıktan sonra karışım balon jodede destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan alabaş gövde ve yaprak ekstraktları ve standart çözeltilerin 750 µl'sine 3 ml reaktif eklendi ve 490 nm'de başlangıç absorbansları ölçüldü. Daha sonra 50°C'de 180 dk inkübe edildi ve son absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Kör deneme için β-karotensiz reaktif kullanıldı. % Total antioksidan aktivitesi, aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Jayaprakasha, 2001).

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t}$$

a = 0.dk'da ölçülen absorbans,
b = inkübasyon sonunda ölçülen absorbans,
t = inkübasyon süresi

$$\%Aktivite = \frac{R_{kontrol} - R_{örnek}}{R_{kontrol}} \times 100$$

3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

Süperoksit anyonu giderme aktivitesi tayini Nishimiki ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi (Nishimiki vd., 1972). Bu metod NADH/PMS/O₂ sistemi ile üretilen süperoksit radikalının, sarı renkli NBT'yi mavi-mor renkli formazan türevine indirgemesi esasına dayanır. Eğer reaksiyon ortamında süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşikler varsa, düşük absorbans değerleri elde edilir.

1 ml 156 µM NBT (Tris-HCl tamponunda, pH=8) ve 1 ml 468 µM NADH (Tris-HCl tamponunda, pH=8) çözeltilerine, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmış alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının ve standart çözeltilerin 1 ml'si eklendi. Reaksiyon karışımına 100 µl 60 µM PMS (Tris-HCl tamponunda, pH=8) eklendikten sonra 25°C'de 5 dk bekletildi. 560 nm'de absorbanları okundu. Kör deneme, bitki örneği yerine destile su konularak yapıldı. % süperoksit radikali giderebilme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{560 \text{ nmde Kontrol Absorbansı} - 560 \text{ nmde Örnek Absorbansı}}{560 \text{ nmde Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

3.2.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini

İndirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Oyaizu,1986). İndirgeme kapasitesi; reaksiyon ortamındaki indirgen maddenin Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgemesi ve ortama $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansının ölçülmesine dayanır. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesini gösterir.

100, 250, 500, 750 ve 1000 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında hazırlanan alabaş gövde ve yaprak ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 ml'sine 2,5 ml fosfat tamponu (0,2 M pH=6,6) ve 2,5 ml % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi eklendi. Reaksiyon karışımları 20 dk. boyunca $50^{\circ}C$ 'de inkübe edildi. 20 dk. sonunda karışımdan 2,5 ml alınarak üzerine 2,5 ml destile su ve 0,5 ml % 1'lik $FeCl_3$ çözeltisi eklendi. 700 nm'de absorbansları okundu. Kör deneme; bitki örneği yerine tamponla yapıldı. Deney sonucu absorbans-konsantrasyon grafiği çizilerek değerlendirildi.

3.2.8. Değerlendirme

Tüm deneyler birbirine paralel üç ölçüm şeklinde yapıldı. Grafikler GraphPad Prism 5 Demo programı kullanılarak çizildi. Hata çubukları grafiklerin üzerinde belirtildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Alabaş bitkisinin gövde ve yaprakları taze olarak ev tipi rondo ile öğütüldükten sonra su, aseton, etanol, metanol kullanılarak dört farklı çözücü ile ekstrakte edildi. Çeşitli metodlarla, tüm ekstraktların antioksidan aktiviteleri incelendi. Ekstraksiyonlar sonunda, örneklerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin yüzde veriminin % 3,085 ile % 8,619 aralığında değiştiği görüldü. Örneklerin ekstraksiyon verimleri Tablo 4.1’de verildi. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi; en yüksek ekstraksiyon verimi % 8,619 ile gövdenin ve %8,229 ile yaprağın metanol ekstraktlarından elde edilmiştir.

Tablo 4.1. Yaprak ve gövde ekstraktlarının çeşitli çözücülerdeki % ekstraksiyon verimi

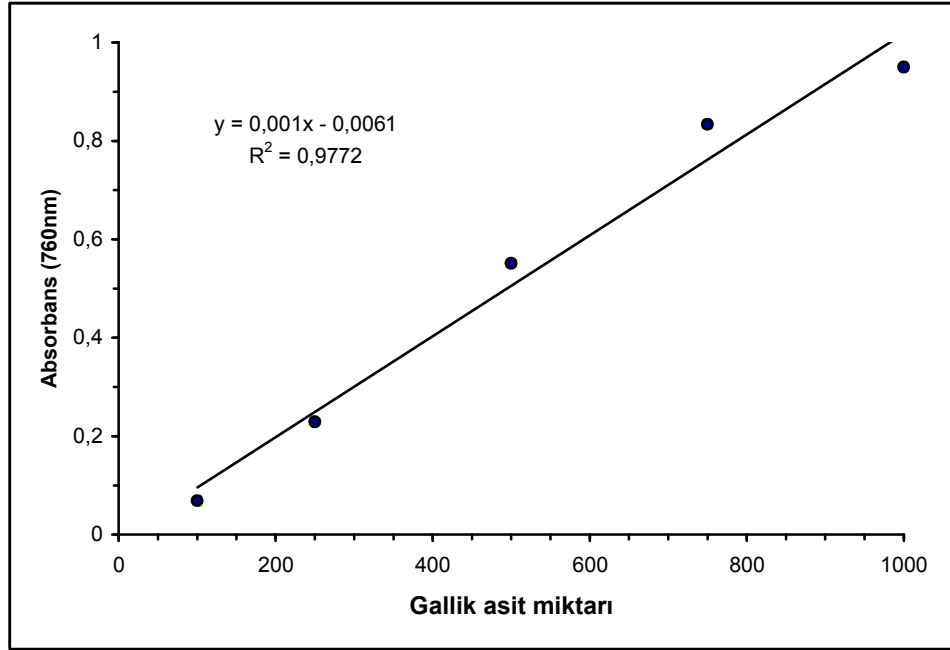
	Çeşitli Çözücülerdeki % Verim			
	Etanol	Metanol	Aseton	Su
Yaprak	5,556	8,229	3,194	3,05
Gövde	7,979	8,619	4,301	3,185

Bu alabaş gövde ve yaprak ekstraktları destile su ile 1000 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Daha düşük konsantrasyonlu örnekler, bu stok çözültiden seyreltilerek hazırlandı. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde içeriği, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, indirgeme gücü, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi ve β -Karoten ağartma yöntemi ile tüm ekstraktların antioksidan aktiviteleri tayin edildi.

4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini

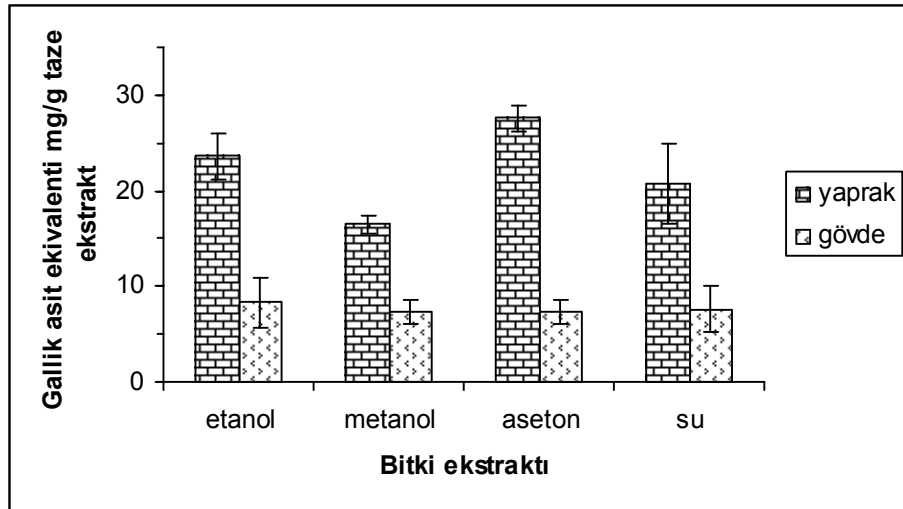
Bitki ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafik (Şekil 4.1) yardımıyla, alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g taze ekstrakt) eşdeğeri olarak hesaplandı.

Standart grafik denklemini yardımıyla mg gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarlarının; yaprak için 16,473–27,582 mg/gr, gövde için 7,323–8,303 mg/gr arasında değiştiği belirlendi.



Şekil.4.1. Gallik asit standart grafiği

Tüm ekstraktların, gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarlarına ait değerler Şekil 4.2’de verildi.



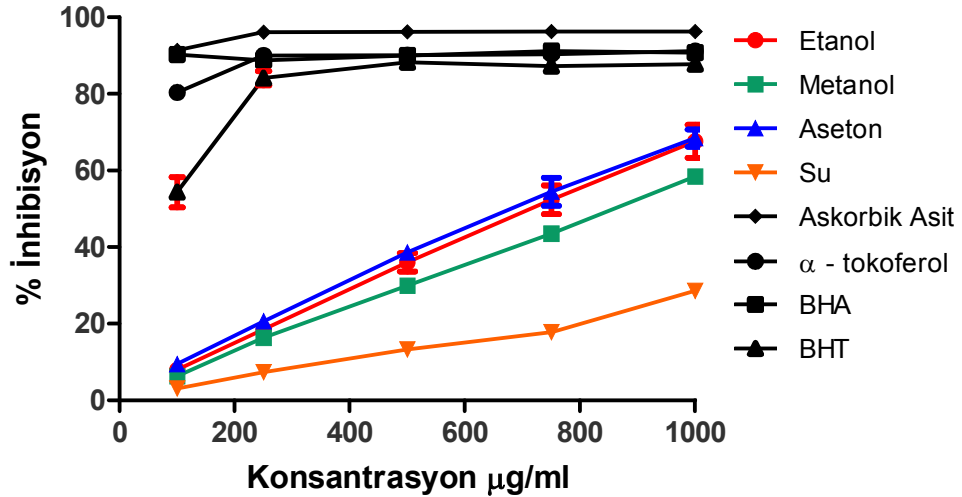
Şekil 4.2. Bitki ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere; yaprak ve gövdenin fenolik madde içeriğinde belirgin bir fark vardır. Alabaş yapraklarının fenolik madde içeriği gövdeninkinden yaklaşık üç kat daha yüksek olarak belirlendi. Yaprak ekstraktlarının fenolik madde içeriğinin ekstraksiyonda kullanılan çözücü açısından karşılaştırıldığında aseton>etanol>su>metanol şeklinde azaldığı görülmektedir.

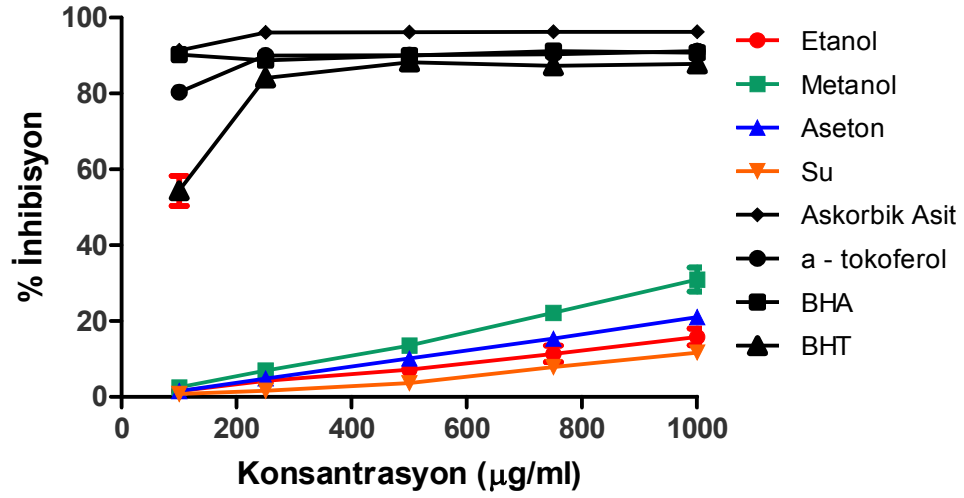
4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

Doğal antioksidanların serbest radikal giderme aktivitesini ölçmek için kullanılan radikallerden biri de DPPH radikalidir. Alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali kullanılarak tayin edildi. Standart madde olarak C vitamini, E vitamini, BHA ve BHT kullanıldı.

Ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktivitelerine ait konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri çizildi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Yaprak ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi



Şekil 4.4. Gövde ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi

Şekil 4.3 ve 4.4 incelendiğinde; DPPH radikali giderme aktivitesi bakımından alabaş yaprak ekstraktlarının, gövde ekstraktlarından daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi.

Alabaş yaprak ve gövde ekstraktlarının artan konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak DPPH radikali giderme aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. Alabaş gövdesinden elde edilen tüm ekstraktlar ile yaprağın su ekstraktının % inhibisyon değerleri standartlara göre bir miktar düşük bulunmuş ve antiradikalik aktivite yönünden zayıf olarak kabul edilmiştir.

Alabaş yaprağının etanol, metanol ve aseton ekstraktlarının % inhibisyon değerleri yukarıda belirtilen ekstraktlara göre oldukça yüksektir. 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda radikal giderme aktivitesi yönünden standartlarla karşılaştırılabilir yükseklikte değerler elde edilmiştir. Alabaş yaprağının aseton, etanol, metanol ekstraktlarının 750 µg/ml'lik konsantrasyonlarında sırasıyla % 54.3, % 52.4 ve % 43.6 radikal giderme aktiviteleri gözlenirken 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ise sırasıyla % 68.3, % 67.5 ve % 58.3 aktivite gözlenmiştir.

EC₅₀ değeri; reaksiyon ortamındaki DPPH radikalının % 50'sinin yakalanması için gereken antioksidan konsantrasyonudur ve düşük EC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesini göstergesidir. Alabaş ekstraktlarının radikal giderme aktivitelerinden çizilen % inhibisyon-konsantrasyon grafikleri yardımıyla EC₅₀ değerleri belirlendi ve Tablo 4.2'de verildi.

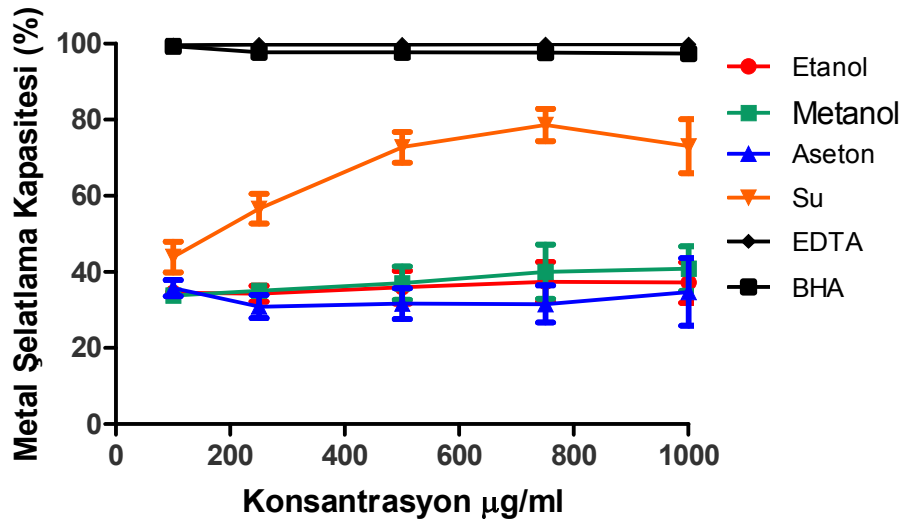
Tablo 4.2. Alabaş ekstraktlarının EC₅₀ değerleri tablosu

EC ₅₀ Değerleri (µg/ml)				
	Etanol	Metanol	Aseton	Su
Yaprak	11,11	12,94	9,04	20,50
Gövde	16,69	21,93	17,57	228,3
C Vitamini				0,065
E Vitamini	0,156			
BHA	0,019			
BHT	0,061			

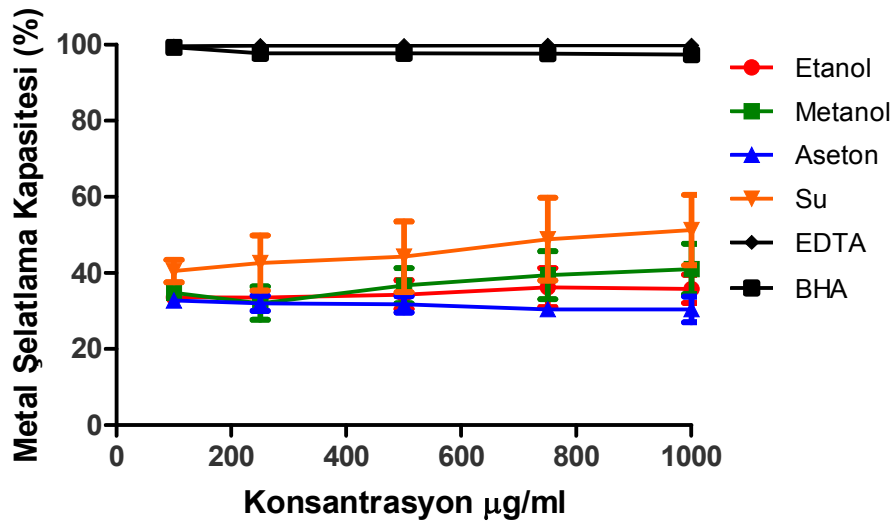
Tablo 4.2'de görüldüğü gibi tüm ekstraktlar içinde en düşük EC₅₀ değerini yaprağın aseton ekstraktı, en yüksek değeri ise gövdenin su ekstraktı vermiştir.

4.3. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Bu denemede sonuçlar; çözeltide bulunan Fe²⁺ iyonlarını bağlayabilme açısından alabaş bitkisinin yaprak ve gövde ekstraktları ile ferrozinin yarışmasına göre değerlendirildi. Standart olarak EDTA ve BHA kullanıldı. Her iki bitki örneğinin metal şelatlama kapasitesini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri çizildi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



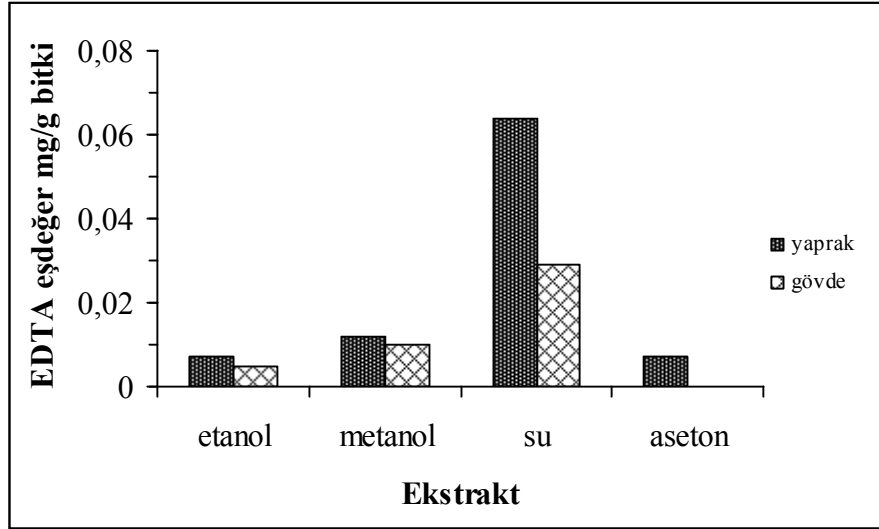
Şekil 4.5. Yaprak ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi



Şekil 4.6. Gövde ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi

Şekil 4.5 ve 4.6'ya göre; alabaş bitkisinin yaprak ve gövde ekstraktları karşılaştırıldıklarında yaprak ekstraktının gövdeden daha yüksek Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Yaprığın su ekstraktı yaklaşık % 80 aktivite ile tüm ekstraktlar arasında en iyi Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi gösterirken; diğer tüm ekstraktların % 30-40 civarında Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Tüm ekstraktların sahip olduğu metal şelatlama aktivitesi ‘‘EDTA eşdeğer mg/g taze bitki’’ cinsinden hesaplandı ve elde edilen verilerden grafik oluşturuldu (Şekil 4.7).

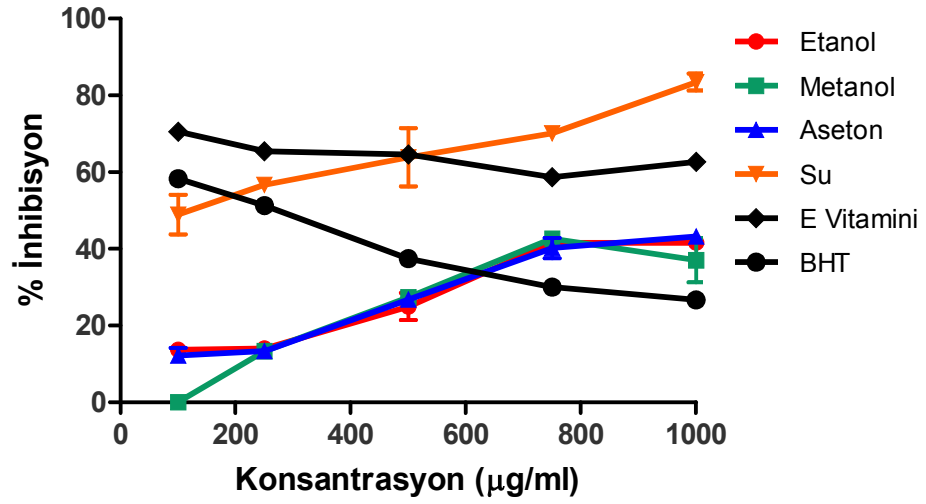


Şekil 4.7. Alabaş gövde ve yaprak ekstraktlarının EDTA eşdeğeri olarak metal şelatlama kapasitesi

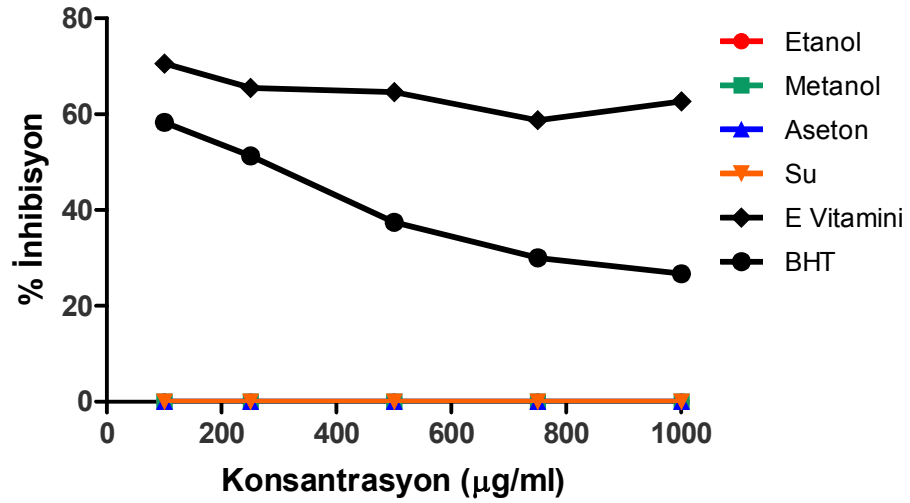
Yaprağın su ekstraktı hariç diğer ekstraktların hiçbirinin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesinin EDTA ile karşılaştırılabilir düzeyde olmadığı görüldü. EDTA çalışılan en düşük konsantrasyonu 100 $\mu g/ml$ 'da bile % 99 şelatlama aktivitesi gösterdi.

4.4. β -Karoten Ağartma Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Alabaş bitkisinin gövde ve yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini, β -karotenin renginin açılmasına dayanan β -karoten-linoleik asit yöntemiyle çalışıldı. Standart madde olarak E vitamini ve BHT kullanıldı. Elde edilen verilerden konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri çizildi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Yaprak ekstraktlarının. β-karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitesi



Şekil 4.9. Gövde ekstraktlarının β-karoten ağartma yöntemi ile toplam antioksidan aktivitesi

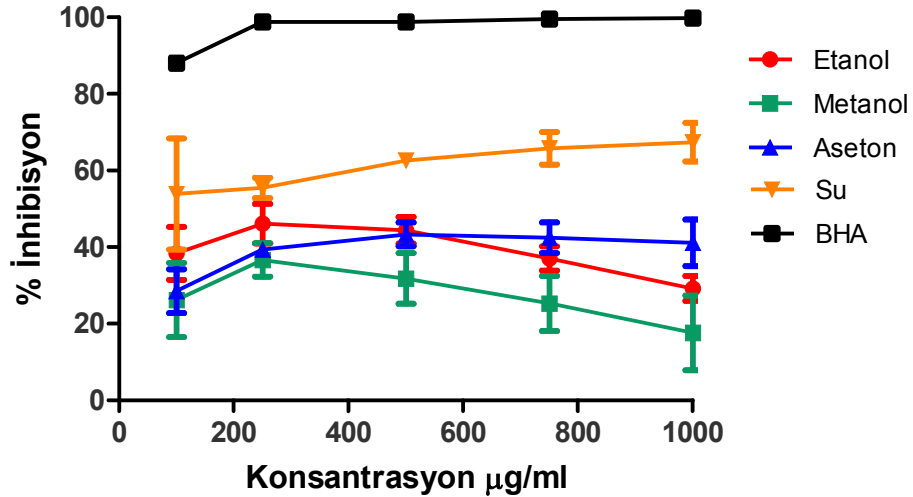
Şekil 4.8 incelendiğinde alabaş yaprak ekstraktlarının β-karoten ağartma yöntemi ile gerçekleştirilen antioksidan aktivite tayininde tüm ekstraktların aktivitesinde konsantrasyon arttıkça artış gözlenmiştir. Yaprığın etanol, metanol, aseton ekstraktları % 15–45 arasında değişen aktivite değerleriyle birbirine çok yakın sonuçlar

verirken; su ekstraktı ise % 45–85 arasında antioksidan aktivite göstermiştir. Su ekstraktının 750 ve 1000 µg/ml’lik konsantrasyonlarında, standart olarak kullanılan E vitamininden daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür.

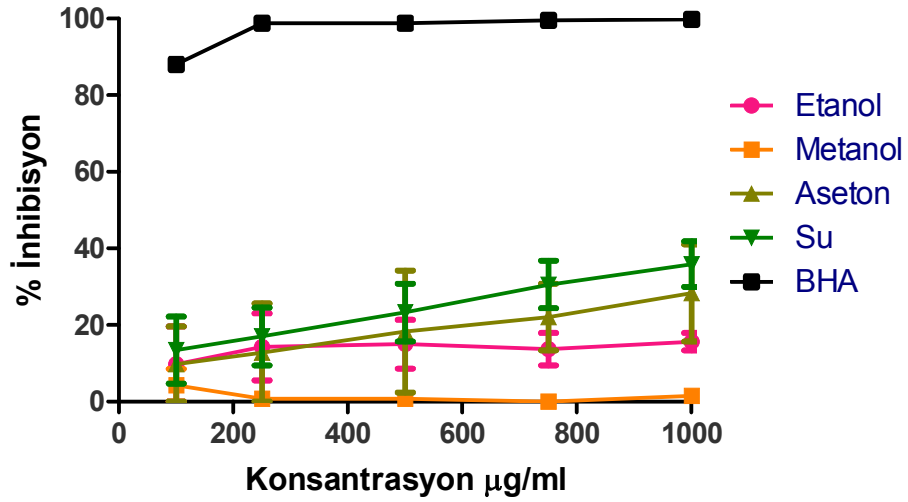
Şekil 4.9’te görüldüğü gibi; alabaş gövde ekstraktlarından hiç birinin β-Karoten ağartma yöntemi ile yapılan antioksidan aktivite tayininde aktivite göstermediği belirlendi.

4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Alabaşın gövde ve yaprak ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesinin tayini için *in vitro* koşullarda PMS/NADH/O₂ sisteminde süperoksit radikali oluşturuldu. Ekstraktların bu radikali etkisizleştirebilme kapasiteleri belirlendi. Standart madde olarak BHA kullanıldı. Süperoksit radikali giderme aktivitesini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri çizildi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Yaprak ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi



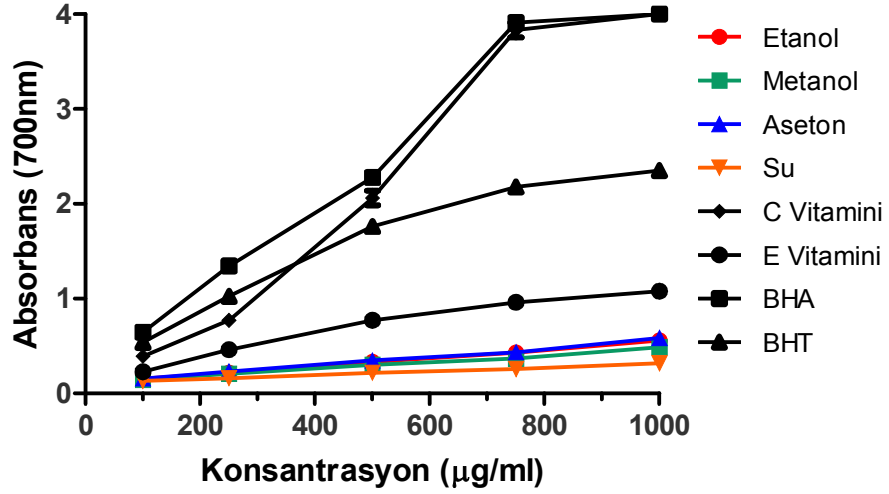
Şekil. 4.11. Gövde ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de görüldüğü gibi; alabaş yaprak ekstraktlarının gövdeye göre daha iyi süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Yaprığın su ekstraktı yaklaşık % 70 gibi yüksek aktivite gösterirken, gövde su ekstraktının aktivitesi ise yaklaşık % 40 civarındadır. Ayrıca yaprağın metanol, etanol ve aseton ekstraktları % 20-45 arasında inhibisyon gösterirken bu değer gövdede aseton ve etanol ekstraktları için maksimum % 25’tir, metanol ekstraktı ise aktivite göstermemiştir.

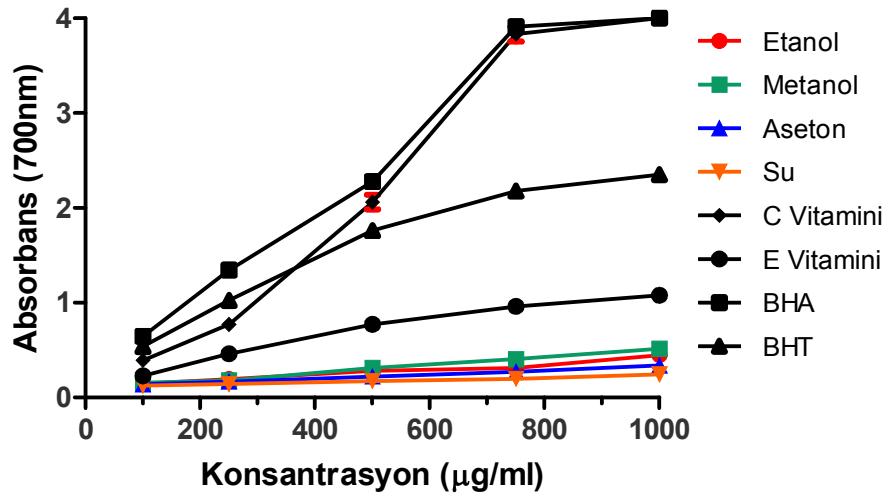
4.6. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Fe^{3+} iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin elektron verebilme yeteneğini gösterir ve bu reaksiyon bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizması olup, diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Alabaş gövde ve yapraklarından elde edilen ekstraktların ortamdaki Fe^{3+} ü indirgeme kapasitesini tayin etmek üzere değişen ekstrakt ve standart konsantrasyonlarında çalışıldı ve oluşan komplekslerin absorbanları 700 nm’de ölçüldü. Standart olarak C vitamini, E vitamini,

BHA ve BHT kullanıldı ve her bir ekstrakt için konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.12. Yaprak ekstraktlarının indirgeme kapasitesi



Şekil 4.13. Gövde ekstraktlarının indirgeme kapasitesi

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'da görüldüğü gibi alabaş bitkisinin yaprak ve gövde ekstraktlarının Fe^{3+} 'ü indirgeme kapasitesinin, standartlarla karşılaştırıldığında, çok yüksek olmadığı gözlemlendi.

Alabaş yaprak ve gövde ekstraktları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Fe^{3+} 'ü indirgeme kapasitelerinin yakın olduğu gözlemlendi.

Gövde ve yaprağın metanol ve etanol ekstraktları neredeyse eşit değerler verirken; yaprağın aseton ve su ekstraktlarının gövdeninkilerinden daha yüksek Fe^{3+} 'ü indirgeme kapasitesi gösterdiği gözlemlendi.

Standartların aktiviteleriyle karşılaştırıldığında; tüm ekstraktların Fe^{3+} 'ü indirgeme kapasitesi oldukça düşük düzeyde olduğu görüldü.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tez kapsamında alabaş bitkisinin (*Brassica oleracea* var. *Gongylodes*) yenilebilir kısımları olan yaprak ve gövdesinden elde edilen su, metanol, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelenmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce yapılan kaynak ve literatür araştırması sonucunda alabaş bitkisiyle yapılmış antioksidan aktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Alabaş ile yapılan araştırmalar incelendiğinde; besin içeriğinin belirlenmesi, glikozinat ve uçucu aromatik bileşiklerin ve bu uçucu bileşenlerinin kükürt ve azot içeriğinin belirlenmesi ve yetiştirme koşulları ile ilgili çalışmalarla sınırlı olduğu görülmüştür (Macleod, 1989, Fischer, 1991, Tayefi, 2008).

Gıda endüstrisinde lipid oksidasyonunu engellemek veya azaltmak, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşmasını engellemek, besinsel kaliteyi sürdürmek ve gıdanın raf ömrünü uzatmak amacıyla antioksidan kullanımı gereklidir (Finley ve Given, 1986). Bu gereklilik sebebiyle gıda endüstrisinde; yağlarda ve yağca zengin diğer gıdalarda bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), propil gallatlar (PG), tert-bütül hidroksianisol (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu antioksidanlar üzerinde yapılan çalışmalarda sentetik antioksidanların toksisitesi ve karsinojenik özellikleri olduğu öngörülmektedir. Ayrıca günümüzde toplumun gelir düzeyi yükseldikçe ve beslenme konusundaki bilinç arttıkça sentetik ürünlere şüpheyle bakılır olmuş ve doğal ürünler tercih edilmeye başlanmıştır.

Araştırmacılar ve gıda bilimcileri insan sağlığı açısından potansiyel toksik olabilen sentetik antioksidanların yerine geçebilecek “doğal antioksidanlar” araştırmaya yönelmişlerdir. Bu yönelimde yeryüzündeki geniş dağılımı sebebiyle bitkisel kaynaklar çalışma sebebi olmakta ve bu kaynaklardan elde edilecek doğal antioksidanların sentetik antioksidanlar yerine gıdalara ilave edilmesi hedeflenmektedir. Özellikle kanser ve beslenme arasındaki ilişki dikkate alındığında, antioksidan aktiviteye sahip bitkisel

kaynakların direk tüketimi veya bu materyallerden elde edilecek ekstraktların yemeklik yağlarda ve diğer gıda maddelerinde koruyucu olarak kullanımını önem kazanmaktadır.

Brassicaceae ailesi antioksidan içeriği bakımından, dengeli insan beslenmesinde yer alan çok önemli bir ailedir. Ülkemizde son zamanlarda tanınan ve bu aileye mensup olan Alabaş bitkisi (*Brassica oleracea* var. *Gongylodes*) antioksidan aktivite potansiyeli araştırılmamış bir bitki olması sebebiyle tez konusu olarak seçilmiştir.

Deneylerde alabaş bitkisinin besin olarak tüketilebilen yaprak ve gövde kısımları kullanılmıştır. Çalışma süresince yaprak ve gövdeden elde edilen etanol, metanol, aseton ve su ekstraktlarının DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı, indirgeme kapasitesi, metal iyonlarını şelatlama aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, β -karoten ağartma metoduyla antioksidan aktivite tayinleriyle antioksidan kapasiteleri detaylı olarak incelenmiş ve sonuçlar hem bitki kısımlarının kendi arasında hem de *Brassicaceae* ailesi verileri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Yaprak ve gövdeden ekstrakt katı: sıvı oranı 1: 10 olacak şekilde destile su ile 15 dk. kaynatılarak; etanol; metanol ve aseton ile 5 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda, oda koşullarında ekstrakte edilerek yapılmıştır. Araştırmalarda en çok kullanılan ekstraksiyon yöntemleri; su, metanol, etanol, aseton, petrol eteri, etil asetat, kloroform, diklorometan gibi çözücüler veya çözücü karışımları ile homojenizer kullanarak, oda koşullarında bekleterek, çözücü ile kaynatarak ve Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakt elde edilmesidir. (Nakiboğlu vd. 2007, su vd. , 2007, Silva vd., 2007, Tawaha vd., 2007). Bu çalışmada, ekstraksiyon için yüksek polariteye ve diğer çözücülere göre düşük toksisiteye sahip, ekonomik olarak uygun ve kolay elde edilebilir çözücüler tercih edilmiştir.

Farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücülerle yapılan araştırmalarda % ekstrakt miktarları üzerinde polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğu görülmüştür (Hayouni vd., 2007, Özcan vd., 2007). Bizim çalışmamızdaki ekstraksiyon verimi verileri ise çözücülere göre metanol>etanol>aseton>su şeklindedir (Tablo 4.1).

Fenolik bileşikler bitkiler aleminin önemli doğal bileşenleridir ve son yıllarda gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi giderek önem kazanmaktadır (Nehir El vd., 1999). Çalışmamızda alabaş yaprak ve gövde ekstraktlarındaki toplam fenoliklerin miktarı FCR ile tayin edilerek ekstraktlardaki miktarlar genel standart olarak kabul edilen gallik asit cinsinden hesaplandı. Toplam fenolik madde miktarlarının; yaprak için 16,473 – 27,582 mg/gr, gövde için 7,323 – 8,303 mg/gr arasında değiştiği gözlemlendi.

Alabaş bitkisinin dahil olduğu *Brassicaceae* ailesinin diğer üyeleri ile yapılan fenolik bileşik tayini çalışmalarda; sekiz ayrı türdeki taze brokolinin metanol ekstraktlarının fenolik madde içeriği 19,60 – 41,40 GAE mg/gr aralığında olduğu (Kaur vd., 2006), beyaz lahanaya ve Çin lahanasının su ekstraktları sırasıyla 623,3 , 543,3 GAE µg/gr (Roy vd., 2006), brokoli, karnabahar, çin lahanası ve beyaz lahananın taze ve yenilebilir kısımlarıyla yapılan başka bir çalışmada ise aynı sıra ile 82,2±8,8, 27,8±1,5, 118,9±12,5, 15,3±2,1 GAE mg/100gr bitki (Podsdek, 2007)), kale (süs lahanası) ile yapılan bir çalışmada da taze bitki örneğinin metanol ekstraktının fenolik bileşik içeriğinin % 16-67 mg/gr arasında olduğu (Ayaz vd., 2008), şeklinde sonuçlara rastlanmıştır.

Brassicaceae sebzelerindeki en önemli antioksidanların, toplam antioksidan kapasitesinin % 80'ini kapsayan fenolik bileşikler ve C vitamini olduğu bildirilmektedir (Kusznierewicz vd., 2008). Bitkilerdeki polifenol içeriği bitki türü, tarım süreci, iklim şartları, ışık, hasat zamanı ve depolama gibi pek çok dış etki sebebiyle değişebilir (Heimler vd., 2007). Ekstraksiyon koşulları, süreci ve çözücü özellikleri de fenolik madde içeriği üzerinde etkilidir.

Çalışmamızda alabaş gövde ve yapraklarının serbest radikal giderme aktivitesi, antioksidan aktivite deneylerinde sıklıkla kullanılan bir indikatör olan (Wojdylo vd., 2007, Chen vd., 2007) **DPPH radikali** ile gerçekleştirildi. Mor renge sahip DPPH çözeltisi, bir antioksidan ile etkileştiğinde yapısı değişir ve rengi sarıya döner. Renk değişikliğinin derecesi antioksidan konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Alabaş yaprak ve gövde ekstraktlarının DPPH radikalini giderme kapasiteleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de

görüldüğü üzere; yaprak ekstraktları, gövde ekstraktlarından daha yüksek serbest radikal giderme aktivite göstermiştir. Alabaş yaprağının aseton, etanol, metanol ekstraktlarının 750 µg/ml'lik konsantrasyonlarında sırasıyla % 54.3, % 52.4 ve % 43.6 radikal giderme aktiviteleri gözlenirken 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ise sırasıyla % 68.3, % 67.5 ve % 58.3 aktivite gözlenmiştir.

Ailenin diğer üyeleriyle de DPPH radikali giderme aktivitesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İngiltere, Almanya, Belçika ve Polonya'da yetişmiş beyaz lahanalarla yapılan bir çalışmada, taze lahananın metanol ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi 3.31 – 5.42 µmol/g arasında bulunmuştur (Kusznierewicz vd., 2008). Liyofilize edilmiş taze beyaz lahana ve Çin lahanasının DPPH radikali giderme aktivitesinin sırasıyla % 32 ve % 8 olduğu görülmüştür (Roy vd., 2006). Taze halde metanol ekstraktı alınmış sekiz ayrı tür brokolinin DPPH radikali giderme aktiviteleri % 57.78 – 70.12 arasında değişiklik göstermiştir (Kaur vd., 2006). Taze brokoli yaprak ve gövdesi ile yapılan başka bir çalışmada metanol ekstraktları % 43'ten büyük değerler verirken, aseton ekstraktları hiç aktivite göstermemiştir (Guo vd., 2001). Kale (süs lahanası) ile yapılan bir çalışmada taze bitkinin metanol ekstraktının tüm fraksiyonlarının DPPH radikali giderme aktivitesi gösterdiği ama hepsinin standarttan düşük olduğu bildirilmiştir (Ayaz vd., 2008). EC₅₀ değerlerinin dikkate alındığı bir çalışmada *Brassicaceae* ailesinde en düşük EC₅₀ brokoli ve İtalyan süs lahanasının gösterdiği bildirilmiştir (Heimler vd., 2006).

Alabaş bitkisi aile ile kıyaslandığında yaprak ekstraktlarının iyi seviyede, gövde ekstraktlarının ise bir miktar düşük seviyede DPPH radikali giderme aktivite gösterdiği gözlemlendi.

Bitki ekstraktlarının **Fe²⁺ iyonlarını şelatlama** aktivitesi deneyinde sonuçlar; çözeltilerde bulunan Fe²⁺ iyonlarını bağlayabilmek için alabaş bitkisinin yaprak ve gövde ekstraktları ile ferrozinin yarışmasına göre değerlendirildi.

Alabaş bitkisinin yaprak ve gövde ekstraktları kıyaslandıklarında yaprak ekstraktının gövdeden daha yüksek Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitesi gösterdiği

görülmüştür. Yaprağın su ekstraktı yaklaşık % 80 aktivite ile tüm ekstraktlar arasında en iyi Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Brassicaceae ailesinin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesine ilişkin elde edilen kısıtlı literatürlere göre; karnabaharın metal şelatlama kapasitesinde etkili sonuçlar verdiği (Köksal vd., 2008), taze brokoli yaprak ve gövdesinin metanol, su ve aseton ekstraktlarının şelatlama kapasitesine bakıldığında metanol ve su ekstraktlarının, aseton ekstraktına göre daha yüksek şelatlama kapasitesine sahip olduğu (Guo vd., 2001), süs lahanası ve kırmızı lahananın da içinde bulunduğu bir grup bitki ile yapılan çalışmada en yüksek şelatlama kapasitesini süs lahanası ve kırmızı lahananın gösterdiği (Wold vd., 2006) verilerine ulaşılmıştır.

β -karoten ağartma yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite yönünden alabaş yaprak ve gövde ekstraktlarını incelediğimizde, değişen konsantrasyonlarda yaprağın su ekstraktı ise % 45–85 arasında toplam antioksidan aktivite göstermiştir. Yaprak ekstraktlarının etanol, metanol, aseton ekstraktları % 15–45 arasında değişen aktivite değerleriyle birbirine çok yakın sonuçlar verirken, gövde ekstraktlarının hiç birinin aktivite göstermediği görülmüştür.

Yapılan benzer çalışmalarda; sekiz ayrı türde taze brokolinin metanol ekstraktlarının % 47.23–65.34 arasında değerler verdiği (Kaur vd., 2007); taze halde Brüksel lahanası, lahana ve karnabaharın etanol ve su ekstraktlarının beta karoten ağartma testi ile yapılan toplam antioksidan aktivite deneyinde sonuçların etanol ekstraktları için aynı sırayla % 72.5, 68.5, 47.8, 13.5; su ekstraktları için % 78.4, 73.8, 69.3, 19.5 olduğu bulunmuştur (Kaur ve Kapoor, 2002). Taze haldeki süs lahanası, lahana ve bataklık lahanasının etanol ekstraktları sırasıyla % 50.2, 59.3, 60.3 inhibisyon oranları göstermiştir (İsmail vd., 2004).

Yaprak ve gövde ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarının **süperoksit radikali giderme aktivitesine** ait grafik Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Alabaş yaprak ekstraktlarının gövde ekstraktlarına göre daha iyi süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Yaprağın su ekstraktı yaklaşık % 70 gibi yüksek aktivite gösterirken, gövde su ekstraktının aktivitesi ise yaklaşık % 40 civarındadır.

Bu çalışma kapsamında yapılan, *Brassicaceae* ailesinin diğer üyelerinin süperoksit radikali giderme aktivitesine ilişkin literatür taramasında ulaşılabilen tek veri; karnabaharın su ve etanol ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi deneyinde etkili sonuçlar vermiş olduğudur (Köksal vd., 2008).

İndirgeme kapasitesi tayininde alabaş yaprak ve gövde ekstraktlarının Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilmesi incelendi. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir.

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13 incelendiğinde alabaş bitkisinin yaprak ve gövde ekstraktlarının Fe^{3+} 'ü indirgeme kapasitesinin, alabaş yaprak ve gövde ekstraktları karşılaştırıldığında yakın olduğu gözlemlendi. Standartlarla karşılaştırdığımızda ise ekstraktların aktivitesinin çok yüksek olmadığı gözlemlendi.

Aileyle ilgili indirgeme gücü kapasitesi çalışmaları incelendiğinde; taze brokolinin gövde ve yapraklarının metanol, su ve aseton ekstraktlarıyla yapılan bir çalışmada, metanol ve su ekstraktlarının E vitaminine yakın indirgeme gücü kapasitesi gösterdiği belirtilmiştir (Guo vd., 2001). Karnabaharın indirgeme gücü deneylerinde etkili sonuçlar verdiği (Köksal vd., 2008), kurutulmuş beyaz lahanaya yaprağının etanol ekstraktının ise düşük indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür (Shyamala vd., 2004).

Brassicaceae ailesi, antioksidan özellik gösteren bileşikler açısından zengin bir ailedir. Yüksek polifenolik madde ve yüksek C vitamini içeriğine sahiptir. Antioksidan aktivitenin polifenol ve C vitamini içeriğiyle doğru orantılı olduğu düşünülmektedir. Yapılan literatür araştırmasına göre aileden en yüksek antioksidan aktiviteyi süs lahanası ve en düşük aktiviteyi ise karnabahar göstermektedir (Sikora vd., 2008). Bunun sebebinin karnabaharın yeşil kısımları ile yenilebilen beyaz kısımları arasındaki farklılık olabileceği düşünülmektedir (Heimler vd., 2006).

Tez kapsamında sonuç olarak; alabaş bitkisinin yaprak kısmının antioksidan aktivitesinin gövde kısmından daha iyi olduğu görülmüştür. Alabaş bitkisinin antioksidan aktivitesi *Brassicaceae* aile içinde diğer üyelerle kıyaslanacak olursa; alabaş gövde ve yaprakları süs lahanasından düşük, karnabahardan yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bu çalışma ile elde edilen veriler; son yıllarda günlük beslenmemizde yeni yeni yer almaya başlayan bu bitkinin özellikle yapraklarının taze formda örneğin salata olarak tüketiminin antioksidan savunma sistemimizin serbest radikallerle mücadelesine katkı verici olacağını göstermektedir

6. KAYNAKLAR

Akkuş İ, (1995), Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.

Ayaz F.A., Hayırlıoğlu Ayaz S., Alpay Karaoğlu Ş., Gruz J., Valentova K., Ulrichova J., Strnad M., (2008): "Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities.", *Food Chemistry*, 107, 19-25

Bilaloğlu Guliyev V., Harmandar M., (2000): Flavonoidler: Molekül yapıları, kimyasal özellikleri, belirleme teknikleri, biyolojik aktiviteleri, Aktif Yayınevi, İstanbul.

Blois M.S., (1958): "Antioxidant determinations by the use of stable free radical." *Nature*, 1199-1200.

Chen H.Y., Lin Y.C., Hsieh C.L., (2007): "Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs." *Food Chemistry*, 104, 1418-1424.

Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M., (1994): "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxy radical scavengers." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169.

Eşiyok D., Bozokalfa M.K., (2005): "Alabaş Yetiştiriciliği." *Dünya Gıda Dergisi*, 3, 93-94

Finley J.W., Given P.J.R., (1986): "Technological necessity of antioxidants in the food industry". *Food and Chemical Toxicology*, 24(10/11), 999-1006.

Frankel E.N., Meyer A.S., (2000): "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.

Guo J.T., Chiang S.H., Lin F.I., Chang C.Y., (2001): "Antioxidant Properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan.", *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(2), 96-101

Hagen S.F., Borge G.I.A., Solhaug K.A., Bengtsson G.B., (2009): "Effects of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L var. *Acephala*)." *Post Harvest Biology and Technology*, 51, 36-42.

Halliwell B., (1994): "Free radicals and antioxidants:A personal view." *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.

Halliwell B., Clement M.V., Long L.H., (2000): "Hydrogen peroxida in the human body." *FEBS Letter*, 486, 10-13.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." *In: Methods in Enzymology*, 186, 1-85.

Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barigmo I., Hvattum E., Remberg S.F. vd., (2002): "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants." *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471.

Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., (2007): "The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities iv vitro of Tunisian *Quercus coccifera* and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts." *Food Chemistry* 105(3), 1126-1134.

Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Vincieri F.F., Pomani A., (2006): "Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaiceae* edible varieties." *Food Chemistry*, 99, 464-469.

Huang D., Ou B., Prior R., (2005): "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

İsmail A., Marjan Z.M., Foong C.W., (2004): "Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables.", *Food Chemistry*, 87, 581-586.

İşbilir Ş.S., (2008): "Yaprakları salata ve baharat olarak kullanılan bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi." *Doktora Tezi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Edirne.

Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K., (2001): "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro." *Food Chemistry*, 73, 285-290.

Kaur C., Kapoor H.C., (2002): "Anti-oxidant activities and total phenolic content of some Asian vegetables.", *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 153-161

Kaur C., Kumar K., Anil D., Kapoor H.C., (2007): "Varations in antioxidant activity in broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars." *Journal of Food Biochemistry*, 31, 621-638

Köksal E., Gülçin İ., (2008): "Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.).", *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32, 65-78.

Kusznierewicz B., Bartoszek A., Wolska L., Drzewiecki J., Gorinstein S., Namiesnik J., (2008): "Partial characterization of white cabbage (*Brassica oleracea* var.

capitata f. alba) from different regions by glukosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins.”, *LWT*, 41, 1-9.

Miller N.J., Luiz-Larrea M.B., (2002): “Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants.” *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 12, 39-51.

Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A, Rodwell V.W., (1996), Harper’ın Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi, İstanbul.

Nakiboğlu M., Urek R.O., Kayalı H.A., Tarhan L., (2007):“Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey.” *Food Chemistry* 104. 630-635.

Nehir El S., Karakaya S., Taş A.A., (1999): “Bazı gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin in vitro koşullarda saptanması.” *TÜBİTAK Projesi* No:TOGTAG-1698, İzmir.

Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K., (1972): “The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854.

Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. (Ed.), (2002), İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K., (2002): “Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122-3128.

Oyaizu M., (1986): “Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine.” *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

Özcan M.M., Baydar H., Sağdıç O., Özkan G., (2007): “Türkiye’de ticari açıdan önemli Lamiaceae familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi.” *TÜBİTAK Projesi*, No:TOGTAG-3319, Konya.

Pan Y., Zhang X., Wang H., Liang Y., Zhu J., Li H., Zhang Z., Wu Q., (2007): “Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil.” *Food Chemistry*, 105(4), 1518-1524.

Podsedek A., (2007): “Natural antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review.”, *LWT*, 40, 1-11.

Roy M.K., Takenaka, M., Isobe S., Tsushida T., (2007): “Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some

commonly consumed vegetables: effects of thermal treatment.”, *Food Chemistry*, 103, 106-114.

Samsun Halk Gazetesi Sayı:2688, 2006.

Seven A., Candan G., (1996): “Antioksidan savunma sistemleri.” *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27(1), 41-50.

Shyamala, B.N., Gupta S., Lakshmi A.J., Prakash J., (2005): “Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on heated oils.”, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 239-245.

Sikora E., Cieslik E., Leszczynska, A., Florkiewicz AF., Pisulewski PM., (2008): “The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing.”, *Food Chemistry*, 107, 55-59.

Silva E.M., Souza J.N.S., Rogez H., Rees J.F., Larondelle Y., (2007): “Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region.” *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.

Singleton V.L., Rossi J.A., (1965): “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.” *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Su L., Yin J.J., Charles D., Zhou K., Moore J., Yu L.L., (2007): “Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon, and oregano leaf.” *Food Chemistry*, 100, 990-997.

Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., (2007): “Antioxidant activity and total phenolic of selected Jordanian plant species.” *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.

Türkyılmaz Z., (2003): “İskemi-reperfüzyon zedelenmesinde pentoksifilin, dimetilsülfoksit ve eksojen melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması.” *Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi*. Edirne

Van Der Vliet A., O’neill C.A., Halliwell B., Cross C., Kaur H., (1994): “Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxyxynitrite”. *FEBS Letters*, 339, 89-92

Wojdylo A., Oszmianski J., Czemerys R., (2007): “Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs.” *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.

Wold A.B., Wicklund T., Haffner K., (2006) “Antioxidant activity in commonly grown and consumed vegetables: a screening survey.”, *Journal of Applied Botany and Food Quality–Angewandte Botanik*”, 80(2), 111-115.

Yazıcı C., Köse K., (2004): "Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü." *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2), 56-65.

Url 1: <http://www.bahce.net> (Mayıs 2008)

Url 2: <http://www.genbilim.com> (Mart 2007)

Url 3: <http://www.oktaykara.com.tr> (Mart 2007)

Url 4: <http://www.mustafaaltinisik.org> (Ocak 2007)

Url 5: <http://www.volkanderinbay.net> (Haziran 2008)

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, bilgisini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her durumda yanımda olan, değerli hocam Doç.Dr. Hülya YAĞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman hissettiren sayın hocam Doç.Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na,

Tüm çalışmalarım boyunca gerek kaynak araştırmalarım, gerekse laboratuvar çalışmalarım, yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Arş.Gör.Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR'e,

Yardım ve destekleri için tüm Biyokimya Anabilimdalı'na,

Bitkimin su ekstraktlarının liyofilizasyon işlemini gerçekleştiren Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Programı Öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Hülya ORAK'a,

Bitkimin yetiştirilmesini sağlayan Trakya Üniversitesi, Havsa Meslek Yüksek Okulu, Seracılık Programı Öğr. Gör. Mukadder ÜSTÜN KAYA'ya,

Dil konusunda ne zaman başım sıkışsa yardımına koşan arkadaşım Nilay KARAHAN'a,

Tezimin yazım aşamasında yardımlarıyla yanımda olan kardeşim Elçin AKAGÜN'e çok teşekkür ederim.

Hep benimle olan, destekleri ve sabırları için aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler...

ÖZGEÇMİŞ

26 Temmuz 1982 tarihinde Edirne’de doğdum. İlköğrenimimi Trakya Birlik İlköğretim Okulu’nda 1993 yılında tamamladım. Orta ve lise öğrenimimi 1993-2000 yılları arasında Edirne Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2001 yılında Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nde okumaya hak kazandım.

2006 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2007 yılından bu yana Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Dalı’nda yüksek lisans yapmaktayım.