T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

SORBUS TORMİNALİS (L.) CRANTZ. (AKÇAAĞAÇ YAPRAKLI ÜVEZ)'IN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

GÖZDE HASBAL

DANIŞMAN
PROF.DR. AYŞE CAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Yüksek Lisans Programında Gözde HASBAL tarafından hazırlanan Sorbus torminalis (L.) Crantz. (Akçaağaç Yapraklı Üvez)'ın Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

15 / 07 / 2013

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof. Dr. Ayşe CAN (Danışman) (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

2.Prof. Dr. Nuriye AKEV (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

3.Doç. Dr. Nurten ÖZSOY (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

4.Doç. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

5.Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gözde HASBAL

İTHAF

Her zaman ve her koşulda benimle olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın konusunu belirleyen, bitki materyalinin teminini sağlayan, tez çalışmalarım süresince ve tezimin yazılışında yardımını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli danışman hocam Prof.Dr. Ayşe Can'a ve tezimin şekillenmesinde bilgileriyle bana yol gösteren Sayın Prof.Dr. Nuriye Akev'e,

Çalışmalarım sırasında laboratuvarda yadsınamaz bir katkı sağlamış olan Sayın Doç.Dr. Nurten Özsoy'a, desteği ve yardımları için Sayın Doç.Dr. Pınar Aksoy Sağırlı'ya, deneylerin yapılmasında ve analizlerin değerlendirilmesinde büyük katkı sağlayan, bunun yanında fikirlerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her problemde büyük sabrıyla ve önemli tavsiyeleriyle yanımda olan Araş. Gör. Dr. Tuğba Yılmaz Özden'e ve fikirlerini benden esirgemeyen ve her zaman yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Dr. Özlem Kurt Şirin'e,

Tez çalışmalarım sırasında, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bize farklı bakış açıları kazandıran İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Refiye Yanardağ'a, değerli zamanını harcayıp bütün içtenliğiyle benimle bilgilerini paylaşan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Esra Eroğlu Özkan'a, bitki materyalinin teşhisini yapan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Şükran Kültür'e,

Yüksek Lisans Eğitimim boyunca birlikte olduğum, bana herzaman moral veren, sevgili arkadaşım Biol. Esra Acar'a, önerileri ve yardımcı fikirleri ile bana destek olan, Uzman Biol. Eda Çandöken'e ve Biol. Gülsüm Altıparmak'a ve ayrıca Anabilim Dalı sekreterimiz Ali Kemal Demir'e,

Her zaman yanımda olan desteğini benden hiç esirgemeyen ve bu yolda yürümemde bana özgüven veren aileme en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26844

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI……İİ
BEYAN.....İİİ
İTHAF..... İV
TEŞEKKÜR.....V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT.....XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Serbest Radikaller 4
2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri 5
2.1.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$).....6
2.1.1.2. Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$) 7
2.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 8
2.1.1.4. Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow}$).....8
2.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri 9
2.1.2.1. Nitrik Oksit Radikali ($NO^{\bullet}$) 10
2.1.3. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu 11
2.1.3.1. Lipid Peroksidasyonu.....12
2.1.4. Serbest Radikal Kaynakları.....13
2.1.5. Oksidatif Stres.....16
2.2. Antioksidanlar.....17
2.3. Antioksidanların Sınıflandırılması.....18
2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistem.....19
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (Süperoksit Oksidoredüktaz, EC: 1.15.1.1) ...19
2.3.1.2. Katalaz (CAT) (H_2O_2: H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6).....20

2.3.1.3. Glutation Peroksidaz (GPx) (Glutation: H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC:1.11.1.9) 21
2.3.1.4. Glutation redüktaz (GR) (EC: 1.8.1.7) 21
2.3.1.5. Glutation-S-transfrez (GST) (EC: 2.5.1.18) 21
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem 21
2.3.2.1. Glutation (GSH) 21
2.3.2.2. Askorbik Asid (C Vitamini) 22
2.3.2.3. Ürik Asid 23
2.3.2.4. α–tokoferol (E Vitamini) 24
2.3.2.5. β–karoten (A Vitamini) 25
2.3.2.6. Bilirubin 26
2.3.2.7. Ubikinon (Koenzim Q10; CoQ10) 26
2.3.2.8. Fenoller 26
2.3.2.9. Melatonin 29
2.3.2.10. Transferrin 29
2.3.2.11. Seruloplazmin 29
2.3.2.12. Albumin 30
2.3.3. Sentetik Antioksidanlar 30
2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 31
2.4.1. ABTS Radikal Katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) Giderme Aktivitesi 33
2.4.2. DPPH Radikal ($DPPH^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi Metodu 34
2.4.3. Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü (FRAP) Metodu 35
2.4.4. Süperoksit Radikal Giderme Aktivitesi Metodu 35
2.4.5. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini Metodu 36
2.5. *Sorbus* (Üvez) L. Cinsi Hakkında Genel Bilgiler 36
3. GEREÇ VE YÖNTEM 40
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 40
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 41
3.3. Bitki Materyali 41
3.4. Kullanılan Yöntemler 41
3.4.1. Ekstrelerin Hazırlanması 41
3.4.1.1. Sulu Ekstrenin Hazırlanması 41
3.4.1.2. Etil Asetatlı Ekstrenin Hazırlanması 41

3.4.1.3. Metanollü Ekstrenin Hazırlanması....42
3.4.1.4. Asetonlu Ekstrenin Hazırlanması....42
3.4.2. Antioksidan Aktivite Deneyleri....42
3.4.2.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini....42
3.4.2.2. Gallik Asid Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi....43
3.4.2.3. Total Flavonoid Miktar Tayini....44
3.4.2.4. Kateşin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi....45
3.4.3. ABTS Radikal Katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) Giderme Aktivitesi Tayini....46
3.4.3.1. $ABTS^{\bullet+}$ Giderme Aktivitesi İçin Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi....47
3.4.4. DPPH Radikal ($DPPH^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi Tayini....48
3.4.4.1. $DPPH^{\bullet}$ Giderme Aktivitesi İçin Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi....49
3.4.5. Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü (FRAP) Tayini....50
3.4.5.1. $FeSO_4.7H_2O$ Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi....51
3.4.6. Süperoksit Radikal Giderme Aktivitesi Tayini....52
3.5. İstatiksel Değerlendirme....53
4. BULGULAR....54
4.1. Ekstrelerin Total Fenolik Bileşik Miktarı....54
4.2. Ekstrelerin Flavonoid Miktarı....55
4.3. Ekstrelerin ABTS Radikal Katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) Giderme Aktivitesi....56
4.4. Ekstrelerin DPPH Radikal ($DPPH^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi....58
4.5. Ekstrelerin Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü (FRAP)....59
4.6. Ekstrelerin Süperoksit Radikal Giderme Aktivitesi....60
5. TARTIŞMA....63
KAYNAKLAR....68
ÖZGEÇMİŞ....84

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Reaktif oksijen türleri (Halliwell 2006) 6
Tablo 2-2: ROS'lar ve yol açtığı reaksiyonlar (Halliwell ve Gutteridge 1999) 9
Tablo 2-3: Radikal ve nonradikal reaktif nitrojen türleri (Kılınç ve Kılınç 2003) 10
Tablo 2-4: Serbest radikallerin organizmada meydana getirdiği biyolojik etkiler (Akpoyraz ve Durak 1995) 11
Tablo 2-5: Temel antioksidan savunma sistemi 19
Tablo 2-6: Antioksidan aktivite tayininde kullanılan *in vitro* antioksidan metodların listesi (Badarinath ve ark. 2010) 32
Tablo 4-1: *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin total ekstre edilebilen bileşik (EC), total fenolik bileşik (PC; gallik asid ekivalanı olarak) ve total flavonoid (kateşin ekivalanı olarak) miktarları 56
Tablo 4-2: *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, asetonlu, metanollü ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin $EC_{50\ ABTS}$, $EC_{50\ DPPH}$ ve $EC_{50\ SOD}$ değerleri 62
Tablo 4-3: *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, asetonlu, metanollü ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin $TEAC_{ABTS}$, $TEAC_{DPPH}$ ve FRAP değerleri 62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Memeli hücrelerinde ROS'ların oluşum yolları (Fang ve ark. 2002). 13
Şekil 2-2: Süperoksit radikalinin XOD tarafından oluşturulması (Dröge 2002). 14
Şekil 2-3: Glutation redoks sistemi. 22
Şekil 2-4: Askorbik asid ve dehidroaskorbik asid. 23
Şekil 2-5: β-karotenin molekül yapısı. 26
Şekil 2-6: Gallik asidin molekül yapısı. 27
Şekil 2-7: C_6-C_3-C_6 sistemi ve flavonoidlerin genel yapısı. 27
Şekil 2-8: Kersetinin molekül yapısı. 28
Şekil 2-9: Kateşinin molekül yapısı. 28
Şekil 2-10: ABTS'nin persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan ABTS radikalinin antioksidan ile etkileşimi (Huang ve ark. 2005). 34
Şekil 2-11: Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi. 34
Şekil 2-12: Fe^{III} tuzlarının antioksidan ile etkileşimi (Huang ve ark. 2005). 35
Şekil 2-13: *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. bitkisinin yaprak ve meyvelerinin genel görünüşü. 37
Şekil 3-1: Gallik asid standart eğrisi ve regresyon denklemi. 44
Şekil 3-2: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi. 45
Şekil 3-3: $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi için Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi. 48
Şekil 3-4: $DPPH^{\bullet}$ giderme aktivitesi için Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi. 50
Şekil 3-5: $FeSO_4.7H_2O$ standart eğrisi ve regresyon denklemi. 52
Şekil 4-1: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları. 55
Şekil 4-2: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin total flavonoid miktarları. 55
Şekil 4-3: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlardaki $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri. 56
Şekil 4-4: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri. 57
Şekil 4-5: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlardaki $DPPH^{\bullet}$ giderme aktiviteleri. 58

Şekil 4-6: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin DPPH radikal giderme aktiviteleri. 58
Şekil 4-7: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin ferri iyonu redükleme antioksidan güçleri. 59
Şekil 4-8: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin 10 mg/mL'deki FRAP değerleri (mM Fe^{2+}). 60
Şekil 4-9: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve kersetinin farklı konsantrasyonlardaki süperoksit radikal giderme aktiviteleri. 61
Şekil 4-10: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve kersetinin süperoksit radikal giderme aktiviteleri. 61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

2,2-Azinobis-(3-Etilbenzotiazolin–6-Sülfonik Asid)	ABTS
2,2 - Difenil - 1 - Pikrilhidrazil	DPPH
2,4,6 - Tripiridil-s-Triazin	TPTZ
Butillenmiş Hidroksianisol	BHA
Butillenmiş Hidroksitoluen	BHT
Dehidroaskorbik asid	DHA
Ekstre Edilebilen Bileşik Miktarı	EC
Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü	FRAP
Glutation	GSH
Glutation Peroksidaz	GPx
Glutation Redüktaz	GR
Glutation-S-Transferaz	GST
Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil Radikali	$HO^{\bullet}$
İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid	NADH
Karbontetraklorür	CCl_4
Katalaz	CAT
Ksantin Oksidaz	XOD
Kuru Meyve Ağırlığı	DW
Malondialdehid	MDA
Miyeloperoksidaz	MPO
Nitrik Oksit Radikali	$NO^{\bullet}$
Nitroblue Tetrazolyum	NBT
Okside Glutation	GSSH
Peroksil Radikali	$ROO^{\bullet}$
Peroksinitrit	$ONOO^{-}$
Propil Gallat	PG
Reaktif Oksijen Türleri	ROS
Reaktif Nitrojen Türleri	RNS
Süperoksit Dismutaz	SOD

Singlet Oksijen	$O_2^{\downarrow}$
Süperoksit Radikali	$O_2^{\bullet -}$
Tersiyer Butilhidrokinon	TBQH
Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite	TEAC
Ultraviyole	UV

ÖZET

Hasbal, G. (2013). Sorbus torminalis (L.) Crantz. (Akçaağaç Yapraklı Üvez)'ın Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

S. torminalis meyvelerinin antioksidan aktivitesi su, etil asetat, metanol ve aseton çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstrelerde incelendi. Ekstrelerin total fenolik bileşik ve total flavonoid miktarları, ABTS radikal katyonu, DPPH radikal ve süperoksit radikal giderme aktiviteleri ile ferri iyonu redükleme antioksidan gücü (FRAP) tayin edildi. En yüksek ekstre edilebilen bileşik miktarının sulu ekstrede olduğu gözlemlendi. En yüksek total fenolik bileşik ve total flavonoid miktarlarının sulu ekstrede olduğu saptandı. ABTS radikal katyonu giderme aktivitesi $TEAC_{ABTS}$ ve EC_{50} değerleri şeklinde ifade edildi. En düşük $EC_{50\ ABTS}$ değerine sahip sulu ekstrenin en yüksek $TEAC_{ABTS}$ değerine sahip olduğu görüldü. DPPH radikal giderme aktivitesi $TEAC_{DPPH}$ ve EC_{50} değerleri şeklinde ifade edildi. En yüksek $TEAC_{DPPH}$ değerini sulu ekstrenin, en düşük $EC_{50\ DPPH}$ değerini ise sulu ve etil asetatlı ekstrelerinin gösterdiği saptandı. En yüksek FRAP değerini sulu ekstre gösterdi. Süperoksit radikal giderme aktivitesi tayininde PMS-NADH-NBT sisteminde süperoksit radikali oluşturuldu ve ekstrelerin bu radikali giderme kapasiteleri incelendi. $EC_{50\ SOD}$ değerleri karşılaştırıldığında sulu ve etil asetatlı ekstrelerin en düşük değerlere sahip olduğu görüldü. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin su > etil asetat > aseton > metanol şeklinde sıralandığı ve total fenolik bileşik miktarlarının da bu sıralamaya uygun olduğu saptandı. S. torminalis meyvelerinden elde edilen tüm ekstrelerin antioksidan aktivite gösterdiği ve meyvelerinin doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sorbus torminalis (L.) Crantz., Akçaağaç Yapraklı Üvez, Antioksidan Aktivite, Serbest Radikaller.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26844

ABSTRACT

Hasbal, G. (2013). Determination of Antioxidant Activity in the Sorbus torminalis (L.) Crantz. (Wild Service Tree). Istanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Master of Science Thesis, Istanbul.

The antioxidant activity of S. torminalis fruits has been examined in extracts obtained by using water, ethyl acetate, methanol and acetone solvents. Total phenolic compounds of extracts and their amounts of total flavonoids, ABTS radical cation, DPPH radical and superoxide radical scavenging activities and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) have been determined. It was found that water extract has the highest ratio of extraction for total phenolic compounds and total flavonoids. ABTS radical cation scavenging activity was expressed as $TEAC_{ABTS}$ and EC_{50} values. Water extract which has the lowest $EC_{50\ ABTS}$ value exhibited the highest $TEAC_{ABTS}$ value. DPPH radical scavenging activity was expressed as $TEAC_{DPPH}$ and EC_{50} values. While water extract has the highest $TEAC_{DPPH}$ value, water and ethyl acetate extracts have the lowest $EC_{50\ DPPH}$ value. Moreover, water extract has showed the highest FRAP value. For the assay of superoxide radical scavenging activity, superoxide radical was occured by using PMS-NADH-NBT system and the scavenging activity capacity of the extracts for this radical were examined. When the $EC_{50\ SOD}$ values of the extracts were compared, water and ethyl acetate extracts were found to have the lowest values. Antioxidant activities of extracts were sorted in ascending order (water > ethyl acetate > aceton > methanol) and it was shown that total phenolic compound amount was in agreement with this placement. It was concluded that all extracts of S. torminalis fruits have antioxidant activity and that the plant might be a natural source of antioxidants.

Key Words: Sorbus torminalis (L.) Crantz., Wild Service Tree, Antioxidant Activity, Free Radicals.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 26844

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest radikallarin ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres teorisinin kökeni 19. yüzyılın sonlarına dayanmaktadır. Bu yolda atılan ilk adım, H.J.H. Fenton'un 1876 yılında, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile Fe^{2+} iyonlarının varlığında tartarik asidin oksidasyonunun keşfidir (Fenton 1876). 1900 yılında Michigan Üniversitesi'nde Moses Gomberg (1866-1947) tarafından organik serbest radikal yapısındaki trifenilmetil radikalinin keşfi, serbest radikallerle ilgili araştırmaların başlamasına yol açmıştır (Schoepfle ve Bachmann 1948; Ihde 1967).

Serbest radikaller, üzerinde çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücresel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücresel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması, pek çok klinik durumun patojenezine açıklık getirmiştir (McCord 1985; Halliwell ve Grootveld 1987; Slater 1987).

Oksijen canlı sistemler için oldukça güçlü bir zehirdir. Oksijen, metabolik işlemler esnasında çok daha reaktif şekilleri olan, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan, H_2O_2, singlet oksijen ($O_2^{\downarrow}$), süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikallerine ($HO^{\bullet}$) çevrilebilir (Cadenas ve Packer 1996). Canlılarda $HO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$, nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$) ve peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) gibi serbest radikaller oldukça önemlidir. Son 30 yılda tıp ve biyolojide serbest radikallerin rolü ve önemi ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Halliwell 1994).

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkenlerin etkisiyle de oluşabilir (Bolzán ve ark. 1997; Schoneich 1999). Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur.

ROS'lar, enzim aktivitelerine ve diğer enzimatik olmayan maddelere bağlı olarak bir savunma sistemi tarafından kontrol edilmektedir. ROS ve vücudun savunma sistemi arasındaki dengesizlik ‘‘oksidatif stres’’ olarak adlandırılmaktadır (Baskin ve Salem 1997).

Serbest radikallerin neden olduğu kronik metabolik hastalıklardan özellikle ateroskleroz ve diabet en çarpıcı örneklerdir. Kanser, romatoid artrit, katarakt ve Parkinson oksidan moleküllerin etkin olduğu hastalıklar arasında kabul edilmektedir (Özdemir 1993).

Antioksidanlar hidrojen atomu ve elektron vericisi olarak etki gösterirler ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürürler. Bu şekilde oluşan antioksidan radikali, oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki çiftleşmemiş elektronun yer değiştirmesiyle stabilize olur. Bu nedenle antioksidan moleküller yapılarında genellikle fenolik gruplar taşırlar (Kähkönen ve ark. 1999).

Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Pehluvan ve Güleryüz 2004).

Gıdalarda kullanılan butillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve butillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde bu maddelerin kullanılmalarına ciddi sınırlamalar ve yasaklar getirilmiştir (Öztürk ve ark. 2002; Koşar ve ark. 2002; Köksal 2007; Yağcı ve ark. 2008). Bu nedenle doğal antioksidan kaynağı olan meyve ve sebzelere olan ilgi artmıştır.

Sorbus (üvez) L. cinsi Rosaceae familyasında yer almaktadır. *Sorbus* cinsinin ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren 12 türü ve 17 taksonu vardır (Gökşin 1982; Baytop 1994; Baytop 1999; Gültekin ve Gültekin 2006; Gültekin 2011). Bunlardan en önemlileri üvez (*Sorbus domestica* L.), kuş üvezi (*Sorbus aucuparia*) ve akçaağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*)'dir (Gültekin ve Alan 2007; Gültekin 2011).

Sorbus torminalis (L.) Crantz. (akçaağaç yapraklı üvez), ağacı üvez cinslerinin en fazla boylanan türüdür. Bu tür, 25 m boya ve 75 cm çapa ulaşabilen, beyaz çiçekli, görkemli bir orman ağacıdır. Meyve şekil olarak armut biçiminde (1-2 cm) olup, olgun meyveler, kırmızımtırak kahve renktedir (Şekil 2-13), (Gültekin 2011).

Çalışmamızda *S. torminalis* meyvelerinin antioksidan kapasitelerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla *S. torminalis* meyvelerinden hazırlanan sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin tayininde önce total fenolik bileşik ve total flavonoid içerik miktarları saptandı. Ekstrelerin ABTS

[(2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin–6-sülfonik asid)] radikal katyonu giderme aktivitesi, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal giderme aktivitesi, süperoksit radikal giderme aktivitesi ve ferri iyonu redükleme gücü (FRAP) tayin edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Oksijenin insan yaşamı için çok gerekli olmasına karşın, normal metabolizma sırasında meydana gelen bazı bileşikler vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (Diplock 1998; Schoneich 1999).

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır (Halliwell 1991). Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıda moleküller ise tek, yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu olan bu moleküller oldukça reaktif bir özellikte olup kararsızdırlar. Bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girer ve bu molekülden ya bir elektron alır veya ona bir elektron verirler. Bu şekilde başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu atom veya moleküllere "serbest radikaller" veya "oksidan moleküller" adı verilir (Boveris 1994; Halliwell ve Cross 1994; Stohs 1995; Bohr ve Dianov 1999; Gracy ve ark. 1999).

Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve reaktivitesi yüksek olan bu moleküller, hem hücresel solunumun ve hücredeki redoks potansiyelinin ürünleri olarak, kovalent bağların homolitik kırılması, normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya normal bir moleküle elektron transferi mekanizmaları ile (Kalak 1995; Dündar ve Aslan 2000; Kılınç ve Kılınç 2002) hem de radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi çeşitli dış faktörlerin etkisi sonucunda ortaya çıkabilirler (Logani ve Davies 1980; Stevenson ve ark. 1994; Dündar ve Aslan 2000; Çelik 2005). Serbest radikaller, tek elektronu ile birlikte pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler (Akpoyraz ve Durak 1995).

Radikaller, nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Cheeseman ve Slater 1993);

1. Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarından birinde, diğerinin ise diğer bağ atomunda kalmasıyla sonuçlanan homolitik bağ kırılmasıyla, her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır (Denklem 2-1). Paylaşılmamış elektron taşıyan türler radikalik özellik gösterirler:

$$R \text{ ---------- } X \longrightarrow R^{\bullet} + X^{\bullet} \quad (2\text{-}1)$$

2. Bir molekülden bir elektronun ayrılması sonucu dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa (Denklem 2-2), radikal formu oluşur:

$$X \longrightarrow X^{\bullet} + e^{-} \quad (2\text{-}2)$$

3. Bir moleküle bir elektron katılması ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa (Denklem 2-3), bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir:

$$X + e^{-} \longrightarrow X^{\bullet} \quad (2\text{-}3)$$

Çiftlenmemiş elektronlar serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırarak, bunların protein, lipid, DNA ve nükleotid yapıda koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama ve sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Diplock 1998).

İnsanlarda ve hayvanlarda fizyolojik ve patolojik koşullarda reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif klor türleri üretilebilir (Evans ve Halliwell 2001). Bütün ROS, RNS ve reaktif klor türlerinin oluşması için oksijene ihtiyaç vardır (Fridovich 1999). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir (Halliwell ve Aruoma 1997).

Serbest radikaller memeli hücrelerine zararlıdır ve kronik hastalıkların patojenlerine uygun ortam sağlarlar, ancak makrofajları ve immün sistemdeki fagositleri aktive ederek patojenlerin öldürülmesinde de görev alırlar (McCord 2000). Bundan dolayı, serbest radikallerin fizyolojik olarak sinyal ve düzenleyici moleküller, patolojik olarak oldukça zararlı ve sitotik oksidanlar olmak üzere farklı etkileri vardır (Fridovich 1999).

2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki oksijenden oluşan radikallere ROS adı verilmektedir. ROS'lar dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron ve bir oksijen atomu bulunması ile karakterizedirler. Oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonizan radyasyonun etkimesi ile meydana gelirler (Halliwell ve Gutteridge 1999; Baskin ve Salem 1997; Flora 2007).

ROS olarak adlandırılan bu bileşikler; süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asid (HOCl), singlet O_2 ($O_2^{\downarrow}$), organik peroksit radikali ($RCOO^{\bullet}$), perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet}$) olarak sıralanabilir (Schoneich 1999), (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Reaktif oksijen türleri (Halliwell 2006)

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller	**Formülü**	**Nonradikaller**	**Formülü**
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet -}$	Ozon	O_3
Hidroksil radikali	$HO^{\bullet}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Alkoksil radikali	$RO^{\bullet}$	Hipoklorik asid	HOCl
Peroksil radikali	$ROO^{\bullet}$	Singlet oksijen	$O_2^{\downarrow}$
Hidroperoksil radikali	$HOO^{\bullet}$		
Perhidroksil radikali	$HO_2^{\bullet}$		
Organik peroksit radikali	$RCOO^{\bullet}$		

Aşağıda organizma için önemli olan bazı ROS'lar hakkında bilgi verilmiştir:

2.1.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa "süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)" olarak adlandırılır (Halliwell 1991). $O_2^{\bullet -}$, moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile oluşur (Denklem 2-4), (Becker ve ark. 1999).

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -} \qquad (2\text{-}4)$$

$O_2^{\bullet -}$, fagositlerde patojenlerin savunma mekanizmalarını yok etmek için NADH oksidaz enzimi tarafından fazla miktarda üretilir. $O_2^{\bullet -}$, ksantin oksidaz (XOD) gibi bazı enzimler tarafından üretilmesinin yanı sıra solunum zincirindeki reaksiyonlar sonucunda bol miktarda meydana gelebilmektedir (Ak 2006).

2.1.1.2. Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$)

Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), moleküler oksijene üç elektron transferi ile meydana gelir. Serbest radikallerin çoğu zararlı etkileri $HO^{\bullet}$ ile oluşur. H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek ya da diğer etkilerle $HO^{\bullet}$ oluştururlar (Lloyd ve ark. 1997). $HO^{\bullet}$ oldukça reaktiftir ve hücre bileşenleri ile reaksiyona girer. Örneğin, amino asid kalıntılarını Schiff bazı oluşturmak üzere okside eder. DNA molekülünde purin ve pirimidin bazlarında kimyasal değişiklik ve kırılmalara neden olur (Bishop ve Janet 1996). $HO^{\bullet}$, hücre membranına etki ederek, hızlı bir şekilde lipid radikallerini oluşturarak, lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatmaktadır (Miller 1996).

$HO^{\bullet}$'nin oluşturduğu reaksiyonlar aşağıda gösterilmektedir. Bu reaksiyonlardan Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarıyla H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$'den $HO^{\bullet}$ sentezlenir.

Fenton reaksiyonu: Fenton, geçiş metalleri varlığında H_2O_2'nin indirgenerek $HO^{\bullet}$ oluşturması reaksiyonudur. $O_2^{\bullet-}$ doğrudan Fe^{+3} ile reaksiyona girer (Denklem 2-5) ve oluşan Fe^{+2} ile H_2O_2 indirgenerek $HO^{\bullet}$ radikali oluşturur (Denklem 2-6), (Castro ve Freeman 2001).

Haber-Weiss reaksiyonu: $O_2^{\bullet-}$, Fe^{2+} ve Cu^{2+} katalizörlüğünde H_2O_2 ile reaksiyona girdiği zaman en güçlü radikal olan $HO^{\bullet}$ radikalini oluşturur (Denklem 2-7), (Duthie ve ark. 1989).

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad (2\text{-}5)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-} \text{ (Fenton)} \qquad (2\text{-}6)$$

$$\text{Net: } O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{-} + HO^{\bullet} \text{ (Haber-Weiss)} \qquad (2\text{-}7)$$

Önce Fe^{3+} süperoksit tarafından Fe^{2+}'ye indirgenir. Sonra Fenton reaksiyonu ile H_2O_2'den $HO^{\bullet}$ ve OH^{-} üretilir.

Suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz kalmasıyla da $HO^{\bullet}$ oluşur (Denklem 2-8), (Çaylak 2011).

$$H_2O \xrightarrow{\text{X veya Gama Işını}} H^{\bullet} + HO^{\bullet} \qquad (2\text{-}8)$$

H_2O_2'nin ultraviyole (UV) ışığına maruz kalması ile de $HO^{\bullet}$ oluşabilir (Denklem 2-9), (Çaylak 2011).

$$H_2O \xrightarrow{UV} 2HO^{\bullet} \quad (2\text{-}9)$$

2.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), $O_2^{\bullet -}$'ye bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) (Denklem 2-10) ya da O_2'ye iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile (Denklem 2-11) veya glikolat oksidaz ve D-amino asid oksidaz ile direkt olarak meydana gelir (Flora 2007). H_2O_2 membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılamaz (McCord 1993).

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 \quad (2\text{-}10)$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 \quad (2\text{-}11)$$

Biyolojik sistemlerde H_2O_2'in asıl üretimi, süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, iki proton alarak H_2O_2 ve O_2'yi oluştururlar (Denklem 2-12). Sonuçta, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu reaksiyon "dismutasyon reaksiyonu" olarak bilinir (Halliwell ve Gutteridge 1984).

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (2\text{-}12)$$

2.1.1.4. Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow}$)

Singlet oksijen ($O_2^{\downarrow}$), oksijenin elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan, farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi; $O_2^{\bullet -}$'nin nitrik oksit (NO) ile reaksiyonu ve H_2O_2'in hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (Wright ve ark. 2002). Yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşıyan $O_2^{\downarrow}$, hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asidleri ile doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar (Halliwell 1991).

Bazı ROS'ların oluşturduğu bazı reaksiyonlar Tablo 2-2'de görülmektedir.

Tablo 2-2: ROS'lar ve yol açtığı reaksiyonlar (Halliwell ve Gutteridge 1999)

Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Fe^{2+} ve Cu^{+} iyonlarını geri kazanma yoluyla Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleme, H_2O_2 veya peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumu
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	$HO^{\bullet}$ oluşumu, enzim inaktivasyonu, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$)	Hidrojen çıkarılması, serbest radikallerin ve lipid peroksitlerin üretimi, tiyol oksidasyonu
Ozon (O_3)	Bütün biyomoleküllerin özellikle çift bağ içerenlerin oksidasyonu, sitotoksik aldehid ve ozonit oluşumu
Oksijen (O_2)	Çifte bağlarla reaksiyon, peroksitlerin oluşumu, amino asidlerin ve nükleotidlerin oluşumu
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)	Hidrojen çıkarılması, radikallerin oluşumu; lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin bozunması

2.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri

Reaktif nitrojen türleri (RNS)'nin nitroksil anyonu (NO^-), nitrozil katyonu (NO^+), azot oksitler, S-nitrozotiyol ve dinitrozil demir bileşikleri gibi NO türevi olan çeşitleri vardır. RNS düz kas hücrelerinin, kardiyomiyositlerin, trombositlerin, sinir hücrelerinin ve jukstaglomerular hücrelerin hepsinde değilse bile çoğunda fizyolojik olarak çok önemli rol oynar. Yükselmiş RNS seviyesi nitrozatif strese neden olarak hücrelerin hasar görmesine ya da ölümüne yol açar (Martínez ve Andriantsitohaina 2009).

Organik bileşiklerin yanması ile çok sayıda nitrojenin oksitlenmiş türevleri atmosfere geçer ve atmosferdeki kirleticilerin önemli bir grubunu oluştururlar. Sigara dumanı ve petrol kaynaklı organik bileşiklerin yanması, atmosferdeki nitrojen oksit türlerinin en önemli kaynağını oluşturur. Nitrojenin oksit türlerinin başlıcaları Tablo 2-3'de görülmektedir (Kılınç ve Kılınç 2003).

Tablo 2-3: Radikal ve nonradikal reaktif nitrojen türleri (Kılınç ve Kılınç 2003)

Reaktif Nitrojen Türleri			
Radikaller	**Formülü**	**Nonradikaller**	**Formülü**
Nitrik oksit	NO•	Nitröz asid	HNO_2
Nitrojen dioksit	NOO•	Nitrozil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetraoksit	N_2O_4
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksi nitröz asid	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Alkilperoksi nitritler	ROONO

2.1.2.1. Nitrik Oksit Radikali ($NO^{\bullet}$)

Biyolojik sistemlerde oluşan RNS'lerin en önemlisi olan aynı zamanda en yaygın sinyal iletim moleküllerinden biri olan NO, vücutta bütün hücresel ve organ bazındaki fonksiyonlara katılır. Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu nedenle radikal tanımına uymaktadır. Damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz aracılığıyla L-argininden sentezlenir. Fizyolojik düzeyi endotelyal hücreler tarafından ayarlanan NO, damarsal düz kas hücrelerinin, lökosit adezyonunun, trombosit agregasyonunun, anjiyojenezin, trombozun, damarsal kasılmaların ve gevşemelerin düzenlenmesinde görev alır (Ignarro ve ark. 1999). Düz kaslarda siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar. Bunlara ek olarak, nöron sunucuları tarafından nörotransmitter olarak üretilen NO ve aktif makrofajlar tarafından üretilen NO, immün cevapların oluşmasına ortam hazırlar (Fridovich 1999). NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp zehirli etkiye sahip nitrojen dioksiti (NO_2) oluşturur (Denklem 2-13), (Rayner ve ark. 2009).

$$2NO + O_2 \longrightarrow 2NO_2 \qquad (2\text{-}13)$$

NO'nun vücuttaki ROS'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturduğu (Denklem 2-14) ve bunun da ileri dekompozisyonla $HO^{\bullet}$ radikali meydana getirdiği ifade bildirilmektedir (Denklem 2-15, 2-16).

$$NO + O_2^{\bullet -} \longrightarrow ONOO^- \qquad (2\text{-}14)$$

$$ONOO^- + H^+ \longrightarrow ONOOH \qquad (2\text{-}15)$$

$$ONOOH \longrightarrow NO_2 + HO^{\bullet} \quad (2\text{-}16)$$

2.1.3. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu

Radikaller, reaktif yapıları nedeniyle başta lipidler, proteinler ve nükleik asidler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara zarar verme özelliğindedir (Çelik 2005). Biyolojik ortamlarda meydana gelen radikallerin ortalama difüzyon yarıçapları çok küçük olanlar son derece aktiftir. Düşük aktiviteli radikallerin, difüzyon hızlarının yüksek olmasına karşılık, bunlar anlamlı hücresel tahribatlara yol açamazlar (DelMaestro ve ark. 1980).

Yapılan çalışmalar sonucunda canlı organizmalarda oluşan serbest radikallerin kalp hastalıkları, Parkinson, Alzheimer hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, nörosensoriyel bozukluklar, katarakt ve romatoid artritin yanısıra kanser gelişiminde de önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Keza yaşlanmada cilt kırışıklıkları, böbrek fonksiyonlarında azalma ve immün hastalıklara yatkınlığın artması gibi tablolara da serbest radikallerin neden olduğu bildirilmektedir (Brody 1988). Serbest radikallerin organizmada meydana getirdiği zararlar Tablo 2-4'de gösterilmiştir.

Tablo 2-4: Serbest radikallerin organizmada meydana getirdiği biyolojik etkiler (Akpoyraz ve Durak 1995)

Etkilenen bileşik	Sonuç
Doymamış amino asidler ve kükürt içeren amino asidler (triptofan, tirozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin vb.)	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibisyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişmeler
Nükleik asid bazları	Mutasyon Hücre gelişiminde değişmeler
Karbohidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asidlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α-tokoferol ve β-karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Hiyaluronik asid	Sinovial sıvının vizkositesinde değişim

2.1.3.1. Lipid Peroksidasyonu

Lipid oksidasyonu; başlangıç, ilerleme ve sonuç aşamalarından oluşmaktadır. Oksidasyonun başlangıç aşamasında, başlatıcı bir radikal ($HO^{\bullet}$) ile yağ asidi (Lipid-H) substratının reaksiyonu sonucu H atomu transferi yoluyla bir lipid radikali ($Lipid^{\bullet}$) oluşmaktadır (Denklem 2-17). İlerleme aşamasında, oluşan $Lipid^{\bullet}$'ne oksijen eklenmesiyle lipid peroksil radikali ($Lipid\text{-}O_2^{\bullet}$) meydana gelmekte (Denklem 2-18) ve bu $Lipid\text{-}O_2^{\bullet}$ diğer bir yağ asidi molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek zincir reaksiyonunu başlatır ve lipid hidroperoksitler ($Lipid\text{-}O_2H$) oluşur (Denklem 2-19). Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır (Kaur ve Perkins 1991). Metal iyonları varlığında oluşan peroksid ürünleri bazı enzimatik tepkimeler ile etan, pentan, malondialdehid (MDA) benzeri yıkım ürünlerinin yanı sıra kemilüminesans ve fluresans veren bileşikler oluşturmaktadırlar. Sonuç aşamasında ise oluşan radikaller birbiriyle reaksiyona girerek radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi stabil bozunma ürünlerine dönüşmektedir (Denklem 2-20), (Porter 1985). Lipid peroksidasyon zincirinde çoklu doymamış yağ asidleri suda çözünebilen ürünlere dönüşür ve membran bütünlüğü bozulur (Brody 1988).

$$Lipid\text{-}H + HO^{\bullet} \longrightarrow Lipid^{\bullet} + H_2O \quad \text{(Başlangıç)} \qquad (2\text{-}17)$$

$$Lipid^{\bullet} + O_2 \longrightarrow Lipid\text{-}O_2^{\bullet} \quad \text{(İlerleme)} \qquad (2\text{-}18)$$

$$Lipid\text{-}O_2^{\bullet} + Lipid\text{-}H \longrightarrow Lipid\text{-}O_2H + Lipid^{\bullet} \qquad (2\text{-}19)$$

$Lipid\text{-}O_2^{\bullet}$ + $Lipid\text{-}O_2H \longrightarrow$ alkanlar, alkananlar, alkenaller, 4-hidroksi alkenaller (Sonlanma) (2-20)

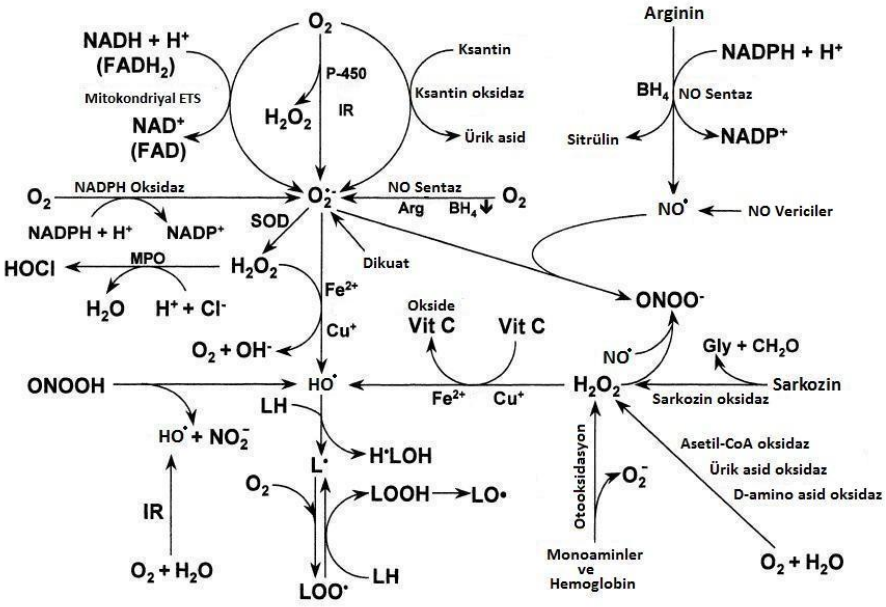
Lipid radikallerinin dönüştüğü sitotoksik ürünlerden en çok bilineni MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asidlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Placer ve ark. 1966; Porter 1985; Niki 1987; Kalender ve ark. 2002).

2.1.4. Serbest Radikal Kaynakları

Organizmada oluşan serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklıdır. Memelilerde, mitokondriyal elektron transport sistemi (ETS), pentoz fosfat yolu, fagositik ve endotelyal hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, araşidonik asid metabolizması (araşidonik asitten tromboksan, prostoglandinler ve lökotrienler oluşumunda), otooksidasyon reaksiyonları esnasında ksantin oksidaz ile NADPH oksidaz gibi enzimlerin etkisiyle meydana gelirler. Eksojen olarak ise endüstriyel kirleticiler, ilaçlar, diyet, iyonizan radyasyon, UV ışık, hava kirliliği, ısı, stres, sigara dumanı ve ksenobiyotikler gibi pek çok faktör serbest radikal oluşumuna ve hücre hasarına neden olabilir (Fridowich 1999; Halliwell ve Gutteridge 1999), (Şekil 2-1).

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROS'lar oluşur (Cross 1987).

Otooksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonudur (Nawar 1996). Serbest radikallerin oksijenle reaksiyonu oldukça hızlıdır ve bu reaksiyonların başlangıcı için birçok mekanizma tanımlanmıştır. Özellikle çoklu doymamış yağ asidleri ve fosfolipidler otooksidasyona eğilimlidir (Porter 1985).

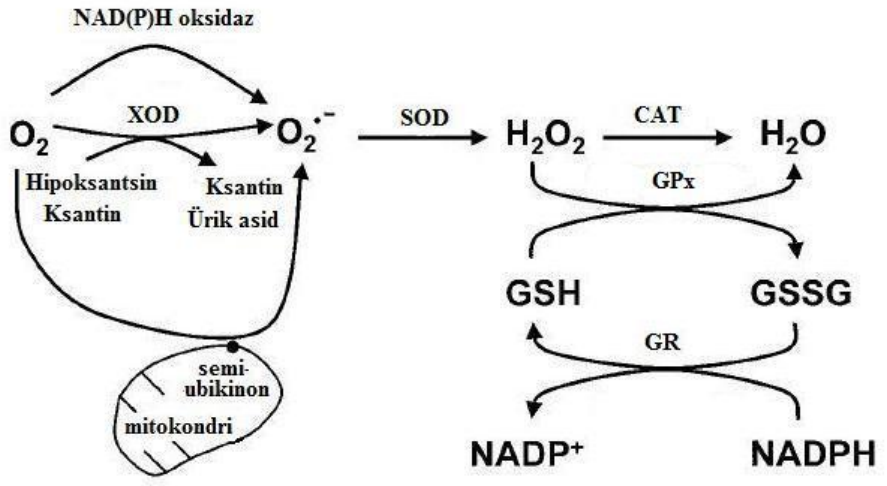


Şekil 2-1: Memeli hücrelerinde ROS'ların oluşum yolları (Fang ve ark. 2002).

IR: İyonizan radyasyon; P-450: sitokrom P-450; ETS: Elektron transport sistemi (solunum zinciri); MPO: Miyeloperoksidaz; LH: Lipid (doymamış yağ asidi); $L^{\bullet}$: Lipid radikali; $H^{\bullet}LOH$: Hidroksi lipid radikali; LOOH: Lipid hidroperoksit; $LO^{\bullet}$: Lipid alkoksil radikali; $LOO^{\bullet}$: Lipid peroksil radikali; BH_4: Tetrahidrobiyopterin, HOCl: Hipoklorik asid; $ONOO^-$: Peroksinitrit.

Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonları da canlı sistemde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalizör olarak görev yapmaktadırlar (Halliwell ve Gutteridge 1990). Biyolojik sistemlerde oksijen taşınması, ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezinde önemli role sahip olan demirin serbest formları canlı hücrelerde toksik etki yapabilmektedir. Bu toksisite sonucunda oluşan aktif oksijen türleri lipid oksidasyonunu teşvik edebilmekte veya DNA moleküllerine saldırabilmektedir (Miller 1996). Birçok metal doğal olarak vücutta kelat oluşturmuş formda bulunur. Örneğin; Cu çeşitli enzimlerde, Fe ise ferritin gibi proteinlerde veya miyoglobin ve hemoglobinin porfirin halkasında bu formda bulunmaktadır (Lindsay 1996). Kelat oluşumu antioksidan savunma sistemine önemli katkıda bulunmakla birlikte, vücutta travma, toksinler, hastalık gibi çeşitli nedenlerle oksidatif reaksiyonları katalizleyebilen serbest metal iyon formlarına dönüşümler gerçekleşebilmektedir. Katarakt, ateroskleroz, diabet gibi patolojik koşullar altında metal iyonlarının serbest ve zararlı formlarda bulunduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Lavelli ve ark. 2000).

ROS, vücutta lipooksijenaz, siklooksijenaz, XOD, miyeloperoksidaz (MPO) ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin aktivitesinin bir sonucu olarak da üretilmektedir (Meydani 2001). XOD, canlı sistemde ROS oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir ve purin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside eder. XOD'ın faaliyeti sonucunda $O_2^{\bullet -}$ ve hidroperoksil radikalleri oluşmaktadır (Lavelli ve ark. 2000), (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Süperoksit radikalinin XOD tarafından oluşturulması (Dröge 2002).

Canlı sistemde oksidan kaynaklarından birisi de, güçlü bir antibakteriyel ajan olan, H_2O_2 tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asid üretimini katalizleyen nötrofilik MPO'dur (Denklem 2-21). Bu reaksiyonun toksisitesi savunma sisteminde bakterilerin öldürülmesine katkıda bulunur. Buna karşılık, oluşan hipoklorik asid aynı zamanda α1-antiproteinazı inaktive etmekte ve sağlıklı insan dokusunu zarara uğratarak iltihaplanmalara neden olmaktadır (Lavelli ve ark. 2000).

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\textit{Miyeloperoksidaz}} HOCl + OH^- \qquad (2\text{-}21)$$

İnflamatuvar ortamlarda nötrofiller serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadırlar. Aslında serbest radikallerin doğrudan aktive olmuş fagositler tarafından üretilmeleri enfeksiyon ajanlarını öldürmek içindir ve bu anlamda vücut savunmasında bu olayın büyük önemi vardır. Ayrıca bu radikaller nötrofilleri olay mahalline göndermek için kemotaktik bir madde üretmek üzere plazma faktörü ile reaksiyona girerek doğrudan akut inflamatuvar cevap oluşumunda rol oynarlar (Arthur ve ark. 1985). İnfeksiyöz olaylarda başta *Staphylococcus aureus* gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatör maddeler nötrofil, eosinofil ve makrofajları aktive ederler, membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla ROS salgılanmasına yol açarlar (Henderson 1994; Natanson ve ark. 1994).

Serbest radikal meydana getiren diğer faktörler ise; kirlenmiş içme sularında bulunan toksik etkili halojenlenmiş hidrokarbonlar ve hava kirleticileri olarak bilinen nitrojen oksitleridir. Karbontetraklorür (CCl_4) ve bromotriklorometan ($CBrCl_3$) gibi hidrokarbonların biyolojik sistemlerdeki oksidatif hasarın başlamasında etkili oldukları bildirilmektedir. CCl_4 metabolizması sırasında P-450 monooksijenaz enzim sisteminin çeşitli amino asid ve doymamış yağlarla hızlı reaksiyonu sonucu triklorometil, triklorometil peroksil radikalleri gibi oldukça reaktif radikallere dönüştürülür. Bunun sonucunda protein denatürasyonları ve lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (Chen ve Tappel 1996).

Hücrelerde peroksizomlar güçlü H_2O_2 kaynağıdır. Bu organeller D-amino asid oksidaz, ürat oksidaz, α- hidroksi asid oksidazdan çok zengin olup, bu enzimler H_2O_2 açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (Ademoğlu 2010).

İskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerdeki aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve ETS'den elektron kaçakları daha fazla olur ve ROS düzeyi artar. ROS'ların düzeyi, yaşlanma süreci ile paralel bir artış gösterir. Yaşlanma ile protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır.

Glukoz gibi maddeler ROS'ları oluşturacak şekilde proteinlerle reaksiyona girerler; bu ise diabetik hastaların seneler boyunca yüksek kan glukozuna maruz kalması nedeniyle hipergliseminin yan etkilerini kolaylaştırıcı "oksidatif stres" oluşumuyla sonuçlanır (Çavdar ve ark. 1997).

Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları (Cross 1987)

I - Normal biyolojik işlemler
  1 - Oksijenli solunum
  2 - Katabolik ve anabolik işlemler
II - Oksidatif stres yapıcı durumlar
  1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
  2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
    a) İnhale edilenler
    b) Alışkanlık yapan maddeler
    c) İlaçlar
  3 - Oksidan enzimler
    a) Ksantin oksidaz
    b) İndolamin dioksijenaz
    c) Triptofan dioksijenaz
    d) Galaktoz oksidaz
    e) Siklooksijenaz
    f) Lipooksijenaz
    g) Monoamino oksidaz
  4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
  5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)
  6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar
  7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
III - Yaşlanma süreci

2.1.5. Oksidatif Stres

Hücresel yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürümesine bağlıdır (Aksoy 2002). Sağlıklı ve zinde bir yaşamı sürdürebilmenin arka planında hem hücresel ve hem de organizmanın oksidan-antioksidan dengesi öne çıkmaktadır. Serbest radikal üreten reaksiyonlar ve antioksidan savunma biyolojik sistemlerde önemli yer tutmaktadır (Sunucu Karafakıoğlu 2010).

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucudur. Esasında serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve infeksiyöz ajanlara karşı savunmasında önemli moleküllerdir (Cheeseman ve Slater 1993; Halliwell 1994; Khan ve Wilson 1995; Peskin 1997; Hogg 1998).

Oksidan moleküller, organizmada başlıca glukozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında ve sonrasında sürekli bir oluşum halindedir ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisizleştirme süreci içerisindedir. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmada bir denge halindedir (Tamer ve ark. 2000). Organizma denge halinde olduğunda herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır (Yen ve Wu 1999). Bu patolojik olaylar oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Halliwell 1997).

2.2. Antioksidanlar

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelere "antioksidanlar" ve bu olaya "antioksidan savunma" denir (Halliwell 1991).

Antioksidan maddeler, organizmanın oksidan-antioksidan dengesini çeşitli antioksidan mekanizmalarından en az biri ile korumaya çalışırlar. Lipid, protein ve DNA moleküllerinde oluşan hasarın onarılması, oluşan serbest radikallerin etki alanlarından toplanarak temizlenmesi, hücresel kinaz kayıplarının önlenmesi, serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonların durdurulması ya da reaksiyon hızının baskılanması ve organizmadaki endojen antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezinin arttırılması başlıca antioksidan mekanizmalarıdır (Packer 1991; Jialal ve Fuller 1993; Gutteridge 1995; Evelson ve ark. 1997; Van-Der-Meulen ve ark. 1997; Stratton ve Liebler 1997).

Antioksidanlar oksidatif strese karşı etkilerini farklı şekillerde gösterirler. Örneğin α-tokoferol, zincir kıran bir antioksidan olarak zincirleme şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları adeta kırar. Glutation (GSH) gibi antioksidan moleküller ise direkt olarak ROS konsantrasyonunu azaltırlar. Süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimler

serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bazı maddeler ise geçiş metalleri ile kelat oluşturarak etkilerini gösterirler. Bu yolla transferrin ve ferritin demirle; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile kelat oluşturarak uyarılan oksidan stresi engellerler (Baskin ve Salem 1997).

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, ortadan kaldıran veya kısmen azaltan mekanizmalara sahip antioksidanlar**,** oksidanları başlıca dört yolla etkisiz hale getirirler (Gökpınar ve ark. 2006).

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Bu etki, ROS'ları tutma ve onları çok daha az reaktif başka bir moleküle dönüştürme şeklinde gerçekleştirilmektedir. Enzimler bu yolla etki etmektedir.

2. Söndürme etkisi (Quencher): Oksidanlarla etkileşip, onlara bir hidrojen atomu aktararak etkisiz hale getiren vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki etmektedir.

3. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

4. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): ROS'ları oluşturacak ve zincirleme reaksiyonlarını başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak inaktif hale getirirler. Hemoglobin ve seruloplazmin bu yolla etki etmektedir.

2.3. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar çeşitli araştırıcılar tarafından farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma çeşitleri aşağıda belirtilmektedir:

A) Antioksidanlar dokulardaki lokalizasyonlarına göre intrasellüler ve ekstrasellüler olarak iki grupta sınıflandırılır.

B) Antioksidanlar fonksiyonlarına göre radikal oluşumunu önleyen (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutation peroksidaz (GPx) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, β-karoten, glutation, ürat) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler (Gutteridge 1995).

C) Makromoleküler (seruloplazmin, transferrin, ferritin, miyoglobin, haptoglobilin) ve mikromoleküler (β-karoten, A vitamini, C vitamini, E vitamini, tokoferoller, tiyol içerenler, glutation (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubikinon) olarak ikiye ayrılır (Gökpınar ve ark. 2006).

D) Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki kısma ayrılabilir.

Primer antioksidan enzimler; SOD, glutation peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT)'dır (Aruoma 1998). Enzimatik olmayan kısmı ise suda ve yağda çözünen radikal tutucular, ve metal iyonlarını bağlayan proteinler oluşturur (Uysal 2010) ve enzimatik olmayan antioksidanlar glutation, C vitamini, ürik asid, E vitamini, A vitamini, bilirubin, ubikinon (koenzim Q10), flavonoidler, melatonin, ferritin, transferrin, haptoglobulin, seruloplazmin, albumin diye sıralanabilir (Aruoma 1998).

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar Tablo 2-5'te verilmektedir.

Çalışmamızda son sınıflandırma yöntemine göre (D sınıflandırılması) antioksidanların özelliklerinden bahsedilecektir:

Tablo 2-5: Temel antioksidan savunma sistemi

Enzimatik	**Enzimatik Olmayan**		
	Suda çözünen radikal tutucuları	**Yağda çözünen radikal tutucuları**	**Metal iyonlarını bağlayan proteinler**
Süperoksit dismutaz	Glutation	E vitamini	Ferritin
Katalaz	C vitamini	β-karoten	Transferrin
Glutation peroksidaz	Ürik asid	Bilirubin	Haptoglobin
Glutation redüktaz		Ubikinon	Seruloplazmin
Glutation-S-transferaz		Fenoller	Albumin
		Flavonoidler	
		Melatonin	

2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistem

2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (Süperoksit Oksidoredüktaz, EC: 1.15.1.1)

Endojen olarak üretilen ve oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan SOD, bir elektron vererek süperoksit anyonunun ($O_2^{\bullet -}$) hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü kataliz ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır (Denklem 2-22), (Larson 1988). SOD'un antioksidan etkisi $O_2^{\bullet -}$ ile Fe^{3+}'ün, Fe^{2+}'ye indirgenmesi sonucunda $HO^{\bullet}$'nin oluşmasının engellenmesi şeklindedir (Baskin ve Salem 1997).

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (2\text{-}22)$$

Bu reaksiyon kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi, SOD katalizörlüğünde 4000 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Akkuş 1995).

SOD beş farklı formdadır: İnsan hücrelerinde özellikle sitoplazmada bulunan bakır ve çinko iyonu içeren (CuZn-SOD) ile mangan iyonu içeren (Mn-SOD) mitokondrial SOD olmak üzere SOD'un iki izoenzimi bulunur. Fe-SOD, *Escherichia coli, Bacteroides fragilis ve Propionibacterium shermanii* bakterilerinde anaerobik ortamda Fe içeren, aerobik ortamda ise Mn içeren SOD enziminin kullanıldığı özel bir sistem şeklinde bulunmaktadır. Ni-SOD, *Streptomyces griseus* bakterisinde tanımlanan homotetramerik yapılı nikel içeren bir izoenzimdir (Baskin ve Salem 1997; Çavdar ve ark. 1997). Ekstraselüler SOD (EC-SOD), Marklund tarafından 1982'de tanımlanmıştır ve CuZn- SOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'dur. EC-SOD, sadece fibroblastlar ve endotelyal hücreler tarafından sentez edilir ve heparan sülfatlara bağlı olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir. Damar endotelinden salınan endotelyal heparin gevşetici faktör plazmada süperoksit tarafından nötralize edildiği için EC-SOD damar tonusunun düzenlenmesinde muhtemel rol oynar (Marklund 1982).

2.3.1.2. Katalaz (CAT) (H_2O_2: H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6)

Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz (CAT) redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalizörlerinden biridir (Larson 1988). SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik H_2O_2, CAT ile su ve atomik oksijene indirgenmektedir (Denklem 2-23), (Duthie ve ark. 1989). H_2O_2, biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle birlikte $HO^{\bullet}$ gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır (Larson 1988).

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2 \quad (2\text{-}23)$$

Yapısal olarak bir hemoprotein olan CAT'ın kovalent olmayan şekilde bağlı protoporfirin IX-Fe (Hem) grubu içerdiği bulunmuştur. Dokularda başlıca mitokondri ve peroksizomlarda bulunmakla beraber, nadiren sitosolde de bulunabilmektedir. CAT, hayvansal organizmaların aerobik hücrelerinde, karaciğer, kemik iliği, mukoz membran, böbrek ve eritrositlerde yoğun olarak bulunur. İnsan eritrositleri CAT'dan zengindir ve kandaki CAT aktivitesi eritrositlerden kaynaklanmaktadır (Sözmen 1997; Akkuş 1995). Beyin, kalp, iskelet kasları ise düşük miktarlarda CAT içermektedir (Garewal 1997).

CAT ve GPx enzimlerinin aktiviteleri artmadan SOD'un aktivitesinin artması H_2O_2'in birikmesine ve böylece $HO^{\bullet}$'nin oluşmasına neden olur (Garewal 1997).

2.3.1.3. Glutation Peroksidaz (GPx) (Glutation: H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC:1.11.1.9)

Eritrosit ve diğer dokularda benzer fonksiyonu bulunan GPx, dört atom selenyum bağladığından dolayı seleno-sistein bileşiği sınıfına girer, katalitik aktivitesini bu özelliği sağlar ve ko-substsrat olarak glutationa gereksinim duyar (Sözmen 1997). H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerinin yıkılımını katalizleyerek membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı koruyan GPx, bu etkisini GSH'ın yükseltgenmesi ile gerçekleştirmektedir. GPx, GSH'ı okside ederek H_2O_2'yu H_2O'ya indirgemektedir (Denklem 2-24), (Garewal 1997).

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow GSSG + 2\ H_2O \qquad (2\text{-}24)$$

2.3.1.4. Glutation redüktaz (GR) (EC: 1.8.1.7)

Glutation redüktaz (GR), NADPH varlığında H_2O_2'nin zehirsizleştirilmesinde okside formuna dönüşen glutation disülfiti (GSSG) tekrar kullanılabilmesi için indirgenmiş GSH'a dönüşmesini sağlar (Denklem 2-25), (Meister 1988).

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+ \qquad (2\text{-}25)$$

2.3.1.5. Glutation-S-transfrez (GST) (EC: 2.5.1.18)

Glutation-S-transferazlar dimerik bir enzim ailesi olup katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Ksenobiotiklerin biotransformasyonunda önemli rol alırlar. Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'ler Se-bağımsız GPx aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar (Denklem 2-26), (Akkuş 1995).

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O \qquad (2\text{-}26)$$

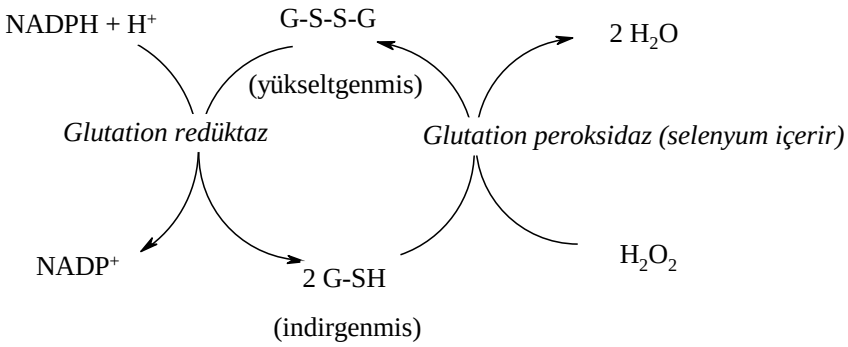
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem

2.3.2.1. Glutation (GSH)

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutation (GSH), serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır.

GSH, vücutta direkt olarak sistein, glisin ve glutamattan sentezlenmektedir (Maher ve ark. 2008).

Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan GSH, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Di Mascio ve ark. 1991). Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GPx enzimi, glutation'un indirgenmiş formunu (GSH), yükseltgenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir (Şekil 2-3). Glutationun normal koşullarda %98.9 kadarı GSH, %0.2 kadarı GSSG şekilde bulunmaktadır. Bir indirgen olarak etki eden glutationun SH grubu indirgenmekte ve bir diğer glutation molekülü ile disülfit köprüsü oluşturmaktadır.



Şekil 2-3: Glutation redoks sistemi.

GSH aynı zamanda hücre içinde $O_2^{\downarrow}$, $O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$ gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Larson 1988).

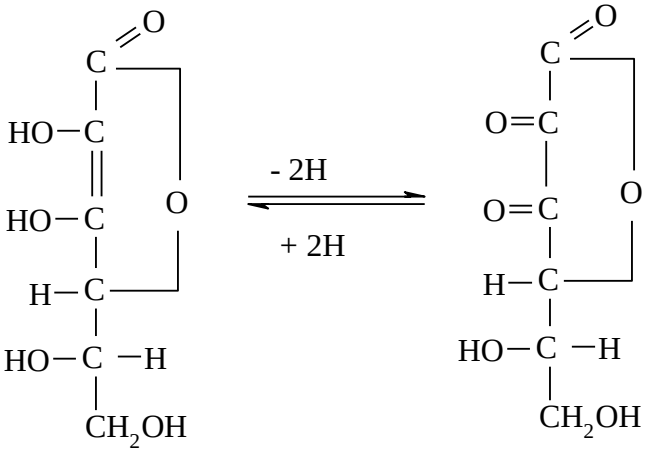
GSH hücrelerde enzim ve diğer hücresel bileşenlerin indirgen halde tutulmamaları için hayati rol oynar. GSH en çok karaciğerde sentezlenir ve yaklaşık % 40'ı safra ile atılır. Safradaki bu GSH'ın diyetteki ksenobiyotiklere karşı vücudu koruduğu, barsak lümenindeki lipid peroksidasyonu önlediği ve barsak epitelyumunu oksijen radikallerine karşı savunduğu düşünülmektedir (Maher ve ark. 2008).

2.3.2.2. Askorbik Asid (C Vitamini)

Askorbik asid (C vitamini) de vücudun ekstrasellüler sıvılarında bulunan ve suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. İnsanlarda L-gulanolakton oksidaz

enziminin eksikliği nedeniyle sentezlenemediği için gıdalarla dışarıdan alınması gerekmektedir (Diplock 1998).

C vitamini, zincir kıran bir antioksidan olması nedeniyle zehirsizleştirme metabolizması esnasında meydana gelen serbest radikalleri ve ROS'ları etkisiz hale getirir (Carr ve ark. 2000) ve indirgeyici (elektron verici) bir ajan olması nedeniyle O_2, nitrat, sitokrom a ve c'yi indirgeyebilir. Bir elektronun verilmesi sonucu askorbat, semidehidroaskorbat radikaline çevrilir ve semidehidroaskorbat radikal ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik asid (DHA)'e okside olur (Şekil 2-6). Askorbat, $O_2^{\bullet -}$ ve $HO^{\bullet}$ ile kolayca reaksiyona girerek DHA oluşturur. DHA, C vitamini kaynağı olarak kullanılır (Akkuş 1995; Baskin ve Salem 1997).



Askorbik asid **Dehidroaskorbik asid**

Şekil 2-4: Askorbik asid ve dehidroaskorbik asid.

C vitamini ayrıca membrana bağlı E vitaminini rejenere etme özelliğine de sahiptir. α-tokoferoksil radikali ile reaksiyona girerek, tokoferol meydana getirirken kendisi de DHA'e dönüşür. Askorbik asid tek başına pro-oksidan etkilidir ve bakır ile demir tuzları için indirgeyici olarak davranmaktadır. Askorbik asid tarafından Fe^{3+}, Fe^{2+}'e dönüştürülmektedir. Fe^{2+} böylece H_2O_2'nin $HO^{\bullet}$'ne çevrilmesine neden olmaktadır (Proteggente ve ark. 2000).

2.3.2.3. Ürik Asid

Ürik asid, endojen olarak serbest radikal temizleyicisi ve antioksidan olarak davranır. Vücut sıvılarında yaklaşık olarak 0,5 mmol/L kadar bulunur ve purin

metabolizmasının son ürünü olarak sentezlenir. Ürik asid güçlü şekilde singlet oksijen, peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) ve $HO^{\bullet}$ temizleyicisidir (Sinha ve ark. 2009).

2.3.2.4. α–tokoferol (E Vitamini)

Tokoferoller (E vitamini), yağda çözünebilen başlıca antioksidanlardan olup tüm hücre membranlarında bulunmakta ve çoklu doymamış yağ asidlerini oksidasyona karşı korumaktadır (Diplock 1998).

Doğada yan zincirlerinin doyurulması ve metilasyon bakımından birbirinden farklı α, β, γ, ve δ-tokoferol ile α, β, γ, ve δ-tokotrienol isminde 8 tip E vitamini bulunmaktadır. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanı α- tokoferoldür (Baskin ve Salem 1997). Tokoferol türlerinin antioksidan aktiviteleri arasında farklar vardır ve singlet oksijeni süpürme kapasitesi α > β > γ > δ tokoferole doğru gittikçe azalır (Kazanç 1997). Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (Akkuş 1995).

E vitamini, insan vücudu için esansiyel olan bir antioksidan bileşiktir ve bu nedenle dışarıdan alınması gerekmektedir. E vitamininin yüksek dozlarda diyete ilavesinin oksidatif strese karşı oldukça koruyucu olduğu bildirilmektedir (Reaven ve ark. 1993; Baskin ve Salem 1997).

Ana fonksiyonu membran fosfolipidlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasar görmesinin önlenmesidir. Lipofilik özelliği nedeniyle hücre membranlarının bilayer yapısı içine girebilmektedir (Gey ve ark. 1991; McNeil ve ark. 2004).

Tokoferol (Tok-OH), bir H atomu ile serbest radikale ($ROO^{\bullet}$) bir elektron transfer ederek, hücre membranı proteinleri ile reaksiyona girmesini ya da lipid peroksidasyonunu başlatmasını engeller. Tokoferol serbest radikal ile etkileştiğinde tokoferol-$O^{\bullet}$ meydana gelir (Denklem 2-27). Eğer askorbik asid ortamda yeterli miktarda var ise, tokoferol-$O^{\bullet}$ ile askorbat reaksiyona girerek tokoferol ve zayıf bir radikal olan DHA meydana gelir (Denklem 2-28), (Baskin ve Salem 1997; Carr ve ark. 2000). Böylece kuvvetli bir radikal etkisiz hale getirilirken, zayıf bir radikal oluşur ve tokoferol-OH tekrar kazanılır.

$ROO^{\bullet} + Tok\text{-}OH \longrightarrow ROOH + Tok\text{-}O^{\bullet}$ (α-tokoferilsemikinon$^{\bullet}$) (2-27)

$Asc + Tok\text{-}O^{\bullet} \longrightarrow DHA + Tok\text{-}OH$ (2-28)

α-tokoferolün Fe^{3+} iyonunu Fe^{2+} iyonuna (güçlü bir pro-oksidan) indirgeyebildiği de gösterilmiştir. Ortamda daha fazla α -tokoferol olması ile bu oluşan Fe^{2+} etkisizleştirilebilir (Baskin ve Salem 1997; Proteggente ve ark. 2000).

2.3.2.5. β–karoten (A Vitamini)

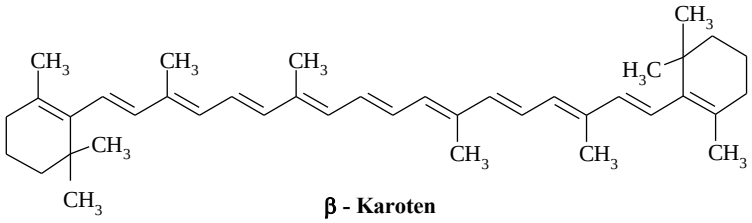
Karotenoidler, birçok meyve ve sebzede bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renk veren pigmentlerdir. Karotenoidlerin moleküler olarak en göze çarpan özelliği; 3-15 konjuge çift bağdan oluşan uzun polien zinciridir. Çoklu doymamış yapıları bu pigmentlere kolay okside olabilen ve stabil olmayan bir yapı kazandırmaktadır. Karotenoidler, hidrokarbonlar (α-, β-, γ-karoten ve likopen) ve ksantofiller (lutein ve kapsantin) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Karotenoidlerdeki çift bağ sayısı arttıkça antioksidan aktivite de artmaktadır (Koca ve Karadeniz 2005).

Karotenoidler antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarına katılarak zararlı H_2O_2'lerin oluşum hızını azaltmak suretiyle gösterirler (Di Mascio ve ark. 1991). β-karotenin antioksidan etkisi singlet oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipidlerini oksidatif dejenerasyona karşı korumasıdır. Singlet oksijenden enerji karotenoide aktarılmakta ve geçici bir ara molekül oluşmaktadır. Düşük oksijen basıncında β-karoten peroksil radikali ile direkt reaksiyona girmekte (Denklem 2-29) ve bu durum yüksek oksijen basıncında E vitamininin aynı etkisi ile sinerji oluşturmaktadır (Baskin ve Salem 1997).

$\beta\text{-karoten} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROO\text{-}\beta\text{-karoten}^{\bullet}$ (2-29)

Ayrıca β-karoten yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan olarak davranmakta ve proteazları aktive etmektedir.

Önemli diyet karotenoidlerinden β-karoten (Şekil 2-5); sarı, turuncu sebze ve meyvelerde, yeşil sebzelerde, likopen; domateste ve lutein; brokoli ve lifli yeşil sebzelerde bulunmaktadır (Diplock 1998).



Şekil 2-5: β-karotenin molekül yapısı.

2.3.2.6. Bilirubin

Hem metabolizmasının memelilerdeki son ürünlerinden biri olan bilirubin ürat ve askorbat ile birlikte plazmanın üç temel antioksidanından biridir (Stryer 1995; Seven ve Candan 1996). *İn vivo* ortamda bilirubin, lipid peroksidasyonunda antioksidan olarak rol oynar. Muhtemelen albumine bağlı yağ asidlerinin peroksidasyonunu önleyebilmektedir. Bilirubin süperoksit ve $HO^{\bullet}$ toplayıcısıdır.

2.3.2.7. Ubikinon (Koenzim Q10; CoQ10)

Ubikinon (CoQ10), endojen sentezlenen yağda çözünen tüm membranlarda bulunan bir antioksidandır. Tüm yaşayan hücrelerde bulunur ve mitokondriler tarafından enerji üretilmesi için gereklidir. Serbest radikallere karşı vücudu korur ve immun direnci arttırır. CoQ10, E vitamini ile sinerjistik çalışır (Podda ve Grundmann-Kollmann 2001; Sumien ve ark. 2009).

2.3.2.8. Fenoller

Fenolik bileşikler bitkiler aleminde yaygın ikincil metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturup, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre değişik gruplara ayrılırlar. Fenolik bileşikler, enfeksiyon, yaralanma ve UV radyasyon gibi stres koşullarına tepki olarak bitkinin normal gelişimi süresince sentezlenmektedir (Justesen ve ark. 1998).

Fenolik bileşikler, fenolik asidler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler. (Bilaloğlu ve Harmandar 1999; Coşkun 2006).

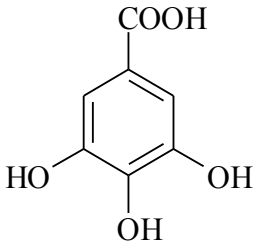
Meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler serbest radikalleri sınırlayıcı antioksidatif etki gösteren güçlü antioksidanlar olarak bilinmektedir (Shadidi ve Naczk 1995) ve indirgen ajan, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı, lipid

peroksidasyonunu katalizleme yeteneğinde olan metallere karşı kelat özelliğindedirler (Rice-Evans ve ark. 1995; Bravo 1998).

Meyve ve sebze bakımından zengin dolayısıyla da fenolik içeriği yüksek olan diyetlerin, kardiyovasküler ve kanser gibi bir takım hastalıkların oranını azaltmada etkili olduğu ortaya konmuştur (Shetty ve Labbe 1998).

Fenolik Asidler

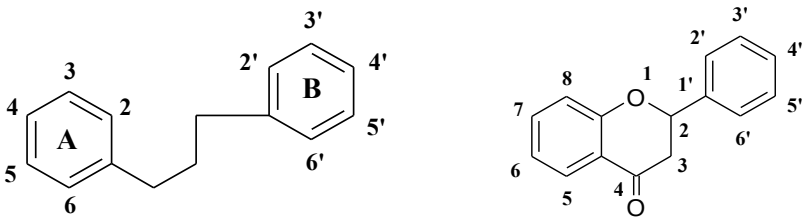
Hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asidler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asidler C_6-C_1 fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asid, *m*-hidroksibenzoik asid, gallik asid, vanilik asidler gibi asidlerdir. Şekil 2-6'da gallik asidin molekül yapısı görülmektedir. Hidroksisinamik asidler ise C_6-C_3 fenilpropan yapısındadırlar.



Şekil 2-6: Gallik asidin molekül yapısı.

Flavonoidler

Flavonoidler, karbon iskeleti iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan, C_6-C_3-C_6 flavon iskeleti üzerine kurulmuş olan, 15 karbon atomu içeren, polifenollerin en yaygın grubudur (Şekil 2-7) (Podsedek 2007).



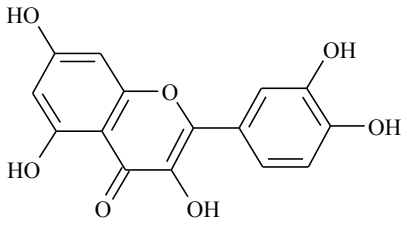
C_6-C_3-C_6 sistemi Flavonoidlerin genel yapısı

Şekil 2-7: C_6-C_3-C_6 sistemi ve flavonoidlerin genel yapısı.

Flavonoidler bitki orijinli yapılar olup günümüze kadar 4000'in üzerinde farklı flavonoid tanımlanmıştır. Flavonoidler yapısal özelliklerine göre; flavonollar ve flavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler, kateşinler (flavanoller) ve lökoantosiyanidinler, proantosiyanidinler olarak beş grupta sınıflandırılmıştır. Flavonoidler, hücre sistemi içerisinde çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (Hollman ve Katan 1997). Flavonoidlerin antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, sitotoksik, antineoplastik, mutajenik, antiinflamatuar, antioksidan ve antitrombotik aktivitelerinin var olduğu belirtilmiştir (Formica ve Regelson 1995).

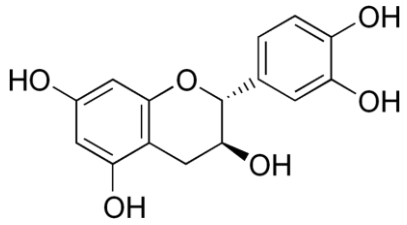
Flavonidler ROS hasarını engelleyebilirler. Serbest radikallere karşı direkt olarak savunucu olarak kullanılabilirler (Hanasaki ve ark. 1994). Flavonoidlerin lipid oksidasyonu üzerindeki etkileri, peroksil radikalleriyle reaksiyona girmeleri sonucunda, elektron transferi yolu ile, $HO^{\bullet}$ ve $O_2^{\bullet -}$ radikallerini yakalamalarıyla ilişkilidir (Koca ve Karadeniz 2005).

Kersetin molekül yapısı itibariyle flavanoidlerin flavonol grubuna girer. Flavonollarda 3. karbon atomuna OH grubu bağlanmıştır (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Kersetinin molekül yapısı.

Kateşinler üçüncü karbon atomunda bir OH grubu içerirler. Kimyasal yapıları flavan-3-ol'dür (Shadidi ve Naczk 1995). Kateşinler gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar (Şekil 2-9), (Saldamlı 2007).



Şekil 2-9: Kateşinin molekül yapısı.

2.3.2.9. Melatonin

Hayvansal antioksidanlardan biri olan ve endojen bir hormon olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)'in en önemli özelliklerinden biri lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite göstermektedir (Seymour ve ark. 1996). Son zamanlarda melatoninin etkili bir serbest radikal yakalayıcısı ve antioksidan olduğu saptanmıştır. Melatoninin çok toksik olan $HO^{\bullet}$'ni, peroksinitrit anyonunu ve peroksil radikalini yakaladığı çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir (Forbes ve ark. 1958). Ayrıca melatoninin Alzheimer hastalığında amiloid β-protein toksisitesini düşürdüğü, Parkinson hastalığının çeşitli tiplerinde oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir. Melatonin, antioksidan etkisini ROS'ları gidermek ve nötrofil birikimini önlemekle direkt olarak göstermekle beraber, indirekt etkisini ise GPx, SOD gibi bazı antioksidatif enzimlerin aktivitesini arttırarak ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek göstermektedir (Reiter ve ark. 1995).

Melatoninin öncülü olan seratonin kan-beyin bariyerini çok az geçebilmesine rağmen, melatonin lipofilik özelliğinden dolayı kolaylıkla geçebilir. Güçlü bir antioksidan olan E vitamini de kan-beyin bariyerini geçemez. Bu geçiş özelliğine sahip olduğundan dolayı melatonin daha üstün bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (Reiter 1996; Bubenik ve ark. 1998).

2.3.2.10. Transferrin

Demir transport proteini olan transferrin sağlıklı insanlarda % 20 - 30 oranında demir ile yüklüdür. Böylece plazmadaki serbest iyonik demirin etkinliği sıfıra dek düşer. Transferrine bağlı demir, lipid peroksidasyon işlemini yapamaz (Çavdar ve ark. 1997).

2.3.2.11. Seruloplazmin

Plazmada bakır taşıyan seruloplazmin, demir metabolizmasında da rol oynayan bir antioksidandır. Seruloplazmin ferrooksidaz aktivitesine sahiptir. 2 değerlikli ferro demiri, 3 değerlikli ferri demire okside eder. Seruloplazminin ferro-oksidaz aktivitesi demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Çavdar ver ark. 1997).

2.3.2.12. Albumin

Her bir molekülünde bir tane sülfhidril grubu taşıdığı için kendi başına serbest radikallere karşı koyar ve primer olarak ekstrasellüler antioksidan savunma sisteminin ana üyesidir. Albumin bakırı sıkı; demiri ise zayıf bir şekilde bağlar ve bağlı metal yüzeyinde kalır. Bu metal Haber-Weiss reaksiyonlarına katılabilir; fakat oluşan $HO^{\bullet}$ albumin tarafından hemen etkisiz hale getirilir. Albuminde meydana gelen hasar, plazmada albuminin çok bol olarak bulunması ve serbest radikallerin diğer antioksidanlar ile de etkisiz hale getirilmesi nedeniyle önemli değildir (Soriani ve ark. 1994).

2.3.3. Sentetik Antioksidanlar

Günümüzde endüstriyel işlemlerde gıda maddelerinin depolanma stabilitelerini artırmak için çoğunlukla butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve propil galat (PG) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların muhtemel toksisiteleri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır (Vareltzis ve ark. 1997).

Butillenmiş hidroksianisol (BHA)

Butillenmiş hidroksianisol (BHA), kimyasal olarak iki izomerin karışımıdır (3-tersiyer butil-4-hidroksianisol ve 2-tersiyer butil-4-hidroksianisol) ve beyaz, mumsu katı bir yapıya sahiptir. Hem bitkisel hem de hayvansal yağlarda çözünür, fakat suda çözünmeyen bir antioksidandır. BHA özellikle uçucu yağların renk, tat ve kokularını korumada ve kısa zincirli yağ asidlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkilidir (Shadidi ve Nazck 1995; Çakmakçı ve Çelik 2000).

Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)

Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), veya kimyasal adıyla 2,6-di-*tert*-butil-*p*-kresol yağda çözünen ve gıda katkı maddesi olarak kullanılan, oksidasyonu önleyici etkisi hayvansal yağlarda bitkisel yağlara oranla daha fazla olan sentetik bir antioksidandır (Parke ve Lewis 1992; Schwarz 1996; Leclercq ve ark. 2000). BHT ayrıca kozmetik preperatlarda, ilaç sanayinde, jet yakıtlarında, lastik ve petrol ürünlerinde antioksidan olarak kullanılmaktadır. Gıda ürününün kendisine katılabildiği gibi, BHA gibi uçucu bir yapıya sahip olduğundan paketleme sırasında da eklenebilir.

Ayrıca yağlar, tahıl ve yağ içeren gıdalara direkt olarak eklenebilir (Meyer ve Hansen 1980; Xiu ve ark. 1994; Simán ve Eriksson 1996; Safer ve al-Nughamish 1999; Takami ve ark. 1999; Klein ve ark. 2003; İbadova 2006).

Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)

Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ) veya diğer adıyla 2-(1,1-dimetiletil)-1,4-benzenediol fenol türü bir organik aromatik bileşiktir. Yağlarda orta derecede, suda ise çok az çözünebilen, beyaz ile sarımsı kahverengi arası renkte ve kristal yapıda olan TBHQ, tert-butil gruba sahip bir hidrokinon türevidir. TBHQ son zamanlarda en iyi gıda katkı maddesi olarak kullanılan antioksidan olarak kabul edilmektedir (Tuner 2007).

Kızartma yağlarını oksidasyona karşı korumak için en iyi antioksidan olarak bilinmektedir. Bej renkli bir toz olan TBHQ, katı ve sıvı yağlarda çözünür. Diğer sentetik antioksidanların aksine bitkisel yağlar için en etkili sentetik antioksidandır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır (Keskin ve Erkmen 1987).

Nordihidroguareyetik asid (NDGA)

Nordihidroguareyetik asid (NDGA), beyaz veya grimsi beyaz kristalimsi, toksik etkisi yüksek, yağdaki çözünürlüğü az olan bir antioksidandır. Gıdalara % 0,01 oranında katılır, pişirilmiş besinlerde bile etkisini korur (Keskin ve Erkmen 1987).

Bu maddenin en önemli özelliği, ısıya karşı duyarlı olması ve ortamdaki demir ile kompleks oluşturarak renk bozulmasına neden olmasıdır. Bu maddenin kullanılmasına pek çok ülkede izin verilmemektedir (Başoğlu 2006).

2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birbiri yerine kullanılır. Fakat farklı anlamlara sahiptirler. Aktivite, spesifik bir antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini kapsar. Kapasite, bir numune tarafından süpürülen belirli bir serbest radikalin miktarının ölçüsüdür. Antioksidan kapasite ölçümleri, örneğin toplam süpürme kabiliyetini belirleyen, heterojen bir antioksidan karışımının miktarını verir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez (MacDonald-Wicks ve ark. 2006).

Antioksidan kapasite tayinleri başlıca üç gruba ayrılabilir (Tablo 2-6):

1. Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
2. Elektron transferi reaksiyonuna dayananlar (ET)
3. Diğer metodlar

Tablo 2-6: Antioksidan aktivite tayininde kullanılan *in vitro* antioksidan metodların listesi (Badarinath ve ark. 2010)

Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
Oksijen radikalini absorplama kapasitesi (ORAC) metodu
Lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesi (LPIC)
Total radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP)
İnhibe edilmiş oksijen alımı (IOC)
Crocin ağartma nitrik oksit radikal önleme aktivitesi
p-NDA ile hidroksil radikal giderme aktivitesi
H_2O_2 radikal giderme
ABTS radikal katyonu giderme metodu
Süperoksit radikal giderme aktivitesi
Elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (EC)
Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite metodu (TEAC)
Ferri iyonu redükleme gücü (FRAP) metodu
DPPH radikal giderme aktivitesi
Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
Total fenolik bileşik miktar tayini
DMPD radikal giderme aktivitesi
Diğer metodlar
Toplam oksidan giderme kapasitesi (TOSC)
Briggs – Rauscher osilasyon reaksiyonunun inhibisyonu
Kemilüminesans
Elektrokemilüminesans
Flurometrik analizler
Gelişmiş kemilüminesans (ECL)
TLC biootografi
Hücresel antioksidan aktivite (CAA) metodu
Boya-substrat oksidasyon metodu

HAT reaksiyonuna dayanan analiz yöntemlerinin çoğu azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır. Metodlar genellikle sentetik bir radikal üreticiden, yükseltgenebilir moleküler probdan ve bir antioksidan bileşikten oluşur (Huang ve ark. 2005; Prior ve ark. 2005)

ET temelli analiz yöntemleri bir reaksiyon karışımında antioksidan ve oksidan olmak üzere iki bileşen içerir. Oksidan, antioksidandan bir elektron alır ve bu oksidanda renk değişimine neden olur (Denklem 2-30). Renk değişiminin derecesi örneğin antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır. (Huang ve ark. 2005).

Oksidan + e^- (antioksidan) $\longrightarrow$ indirgenmiş oksidan + yükseltgemiş antioksidan (2-30)

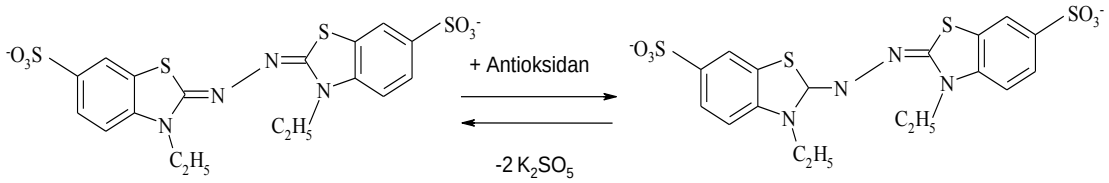
Oksidasyon farklı mekanizmalar ile çok karmaşık bir süreçtir. Bu nedenle toplam antioksidan kapasiteyi tam olarak değerlendirebilecek tek bir yöntem yoktur. Bu çalışmada; *S. torminalis* meyvelerinin antioksidan kapasitesi DPPH radikal giderme aktivite tayini, ABTS radikal katyonu giderme aktivite tayini, süperoksit radikal giderme aktivite tayini, ferri iyonu redükleme antioksidan gücü (FRAP) tayini metodları kullanılarak belirlenmiştir. Meyvelerin ayrıca total fenolik bileşik ve total flavonoid miktarları tayin edilmiştir. Aşağıda çalışmamızda kullanılan metodlar hakkında bazı bilgiler verilmiştir.

2.4.1. ABTS Radikal Katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) Giderme Aktivitesi

Bu yöntem, mavi-yeşil renkli dayanıklı bir bileşik olan 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid) radikalinin ($ABTS^{\bullet+}$) giderilmesi sonucu, renkte meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. $ABTS^{\bullet+}$, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid)'in ($ABTS^{2-}$), persülfatla oksidasyonu sonucu meydana gelir (Şekil 2-10).

Re ve arkadaşları (1999) tarafından modifiye edilen yöntemde, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu $ABTS^{\bullet+}$ oluşmaktadır. Diğer bir deyişle, sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. 7 mM amonyum ABTS tuzu suda çözülür ve 2,45 mM potasyum persülfatla muamele edilir. Bu karışımın kullanılmadan önce oda sıcaklığında 12-16 saat beklemesi, koyu mavi renkli bir çözelti verir. Bu çözelti daha sonra, etanol veya tampon (pH 7.4) ile

absorbansı 734 nm'de 0,70 (± 0,02) olacak şekilde seyreltilir (Huang ve ark. 2005). Bu radikal, toplam radikal giderme kapasitesini ölçmek için kullanılır.



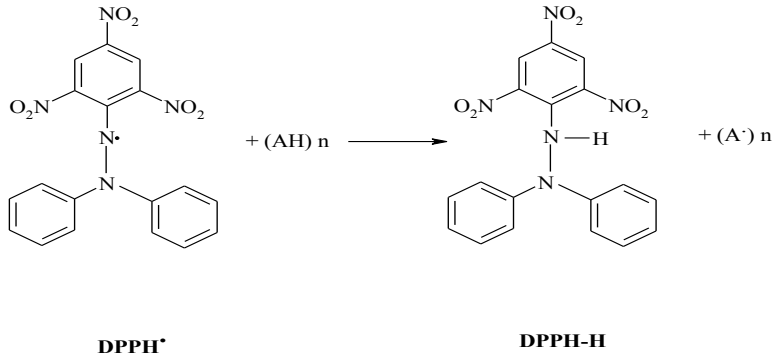
$ABTS^{\bullet-}$ (λmax =734 nm) $ABTS^{2-}$ (renksiz)

Şekil 2-10: ABTS'nin persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan ABTS radikalinin antioksidan ile etkileşimi (Huang ve ark. 2005).

2.4.2. DPPH Radikal ($DPPH^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi Metodu

Bu metod DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin ($DPPH^{\bullet}$) antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak giderilmesi temeline dayanır. $DPPH^{\bullet}$ sentetik olarak üretilen bir radikal olup, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir ve koyu menekşe renktedir (Prior ve ark. 2005). Antioksidanlar tarafından $DPPH^{\bullet}$ giderildiğinde, absorbans azalır ve renk mordan sarıya döner (Matthäus 2002). DPPH çözeltisindeki daha fazla renk açılması, reaksiyon karışımının absorbansında daha fazla düşme, dolayısıyla yüksek radikal giderme kapasitesi demektir (Ndhlala ve ark. 2010), (Şekil 2-11).

Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH derişiminin %50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden EC_{50} (etkin konsantrasyon) değeri ile verilir. EC_{50} değeri ne kadar düşükse antioksidan kapasite o kadar yüksektir (Brand-Williams ve ark. 1995).

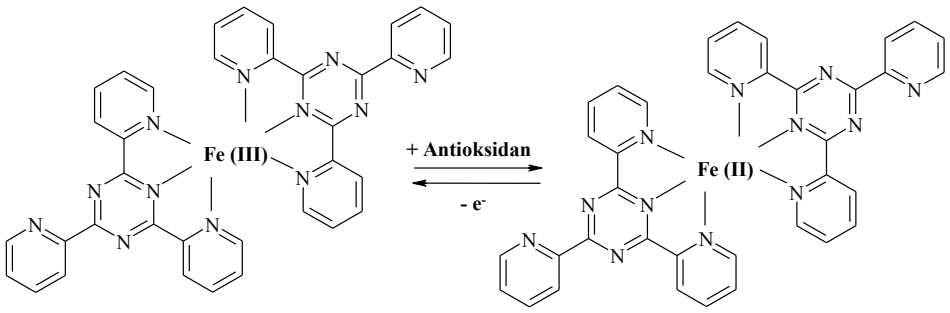


Şekil 2-11: Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi.

2.4.3. Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü (FRAP) Metodu

Ferri iyonu redükleme antioksidan gücü (FRAP) tayininde oksidan olarak Fe^{III} tuzları, $Fe^{III}(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ = 2,4,6-tripiridil-s-triazin) kullanılmaktadır. Burada Fe^{III} tuzu, $F^{III}(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ=2,4,6-tripiridil s-triazin), oksidan olarak kullanılır (Benzie ve Strain 1997). Yöntemin esası, Fe^{III}'ün $[Fe^{III}(TPTZ)_2]^{3+}$ Fe^{II}'ye $[Fe^{II}(TPTZ)_2]^{2+}$ indirgenmesi esasına dayanır (Benzie ve Strain 1996). İndirgeyici güç, potansiyel antioksidan aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir ve elektron verici yeteneklerini yansıtmaktadır (Şekil 2-12).

FRAP yönteminin avantajı elektron-transfer reaksiyonu olmasıdır. FRAP yöntemi nispeten basit bir yöntem olup, kolaylıkla standardize edilebilmektedir. FRAP yöntemi demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3.6) gerçekleştirilir. Düşük pH değerinde, Fe^{III}-TPTZ kompleksi, Fe^{II} formuna indirgenir. Bu kompleks koyu mavi renklidir ve absorpsiyon maksimumu 593 nm'dir (Benzie 1996).



$[Fe^{III}(TPTZ)_2]^{3+}$ $[Fe^{II}(TPTZ)_2]^{2+}$, (λmax=593 nm)

Şekil 2-12: Fe^{III} tuzlarının antioksidan ile etkileşimi (Huang ve ark. 2005).

2.4.4. Süperoksit Radikal Giderme Aktivitesi Metodu

Deney üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolyumu (NBT) indirgemesi sonucunda oluşan mavi-mor renkli formazanların absorbanslarının 560 nm'de okunması esasına dayanır. Fenazin metasülfat-indirgenmiş β-nikotinamid adenin dinükleotid-nitroblue tetrazolyum (PMS-NADH-NBT) sisteminde PMS-NADH bileşeni tarafından oksijenin parçalanmasından $O_2^{\bullet -}$ açığa çıkar. Bu metotta NBT'nin sarı rengi azalarak formazan mavisi oluşur. Eğer ortamda antioksidan madde varsa mavi-mor formazan oluşumu inhibe edilir.

2.4.5. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini Metodu

Fenolik gruplar OH grubunca zengindir, bu gruplar bileşiğe polar olma özelliği katar ve antioksidan özelliğini artırır. Fenollerin hidroksil gruplarının serbest radikalleri yok etme gücü vardır (Hatano ve ark. 1989).

Total fenolik bileşik miktar tayininde kullanılan Folin-Ciocalteu ayıracı molibdofosfotungstik heteropoliasittir. Varsayılan aktif merkezi Mo(VI)'dır. Folin-Ciocalteu ayıracının 1 elektron alması sonucu Mo(VI), Mo(V)'e indirgenerek mavi renkli bileşik oluşur (Denklem 2-31). Reaksiyonda basit olarak elektronun Mo(VI)'e aktarıldığı düşünülür.

$$\text{Mo(VI) (sarı)} + e^- \longrightarrow \text{Mo(V) (mavi)} \qquad (2\text{-}31)$$

Fenolik bileşikler Folin-Ciocalteu ayıracı ile yalnız bazik koşullar altında yükseltgenerek reaksiyona girerler. Fenolik proton bazik ortamda disosiye olur. Fenolik bir protonun ayrılması, Folin-Ciocalteu ayıracını indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonunun oluşmasına neden olur. Fenolat ve Folin-Ciocalteu ayıracı arasında oluşan mavi bileşikler spektrofotometrik olarak ölçülür (Huang ve ark. 2005).

2.5. *Sorbus* (Üvez) L. Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

Sorbus (üvez) L. cinsi sistematik olarak; bitkiler aleminde Magnoliophyta (Angiospermae; Kapalı tohumlular) bölümünde, Rosaceae familyasında yer almaktadır. Üvez bitkisi kışın yapraklarını döken, dikensiz, basit ve pennat yapraklı (lobları ayrı yaprakçıklar) ve beyaz çiçekli ağaç ve ağaççıklardır. *Sorbus* cinsinin dünya üzerinde çok eski devirlerden beri yetiştiği bildirilmektedir. *Sorbus* cinsinin kuzey yarım kürede 80'den fazla türü, ülkemizde ise doğal olarak yayılış gösteren 12 türü ve 17 taksonu vardır (Gökşin 1982; Baytop 1994; Baytop 1999; Gültekin ve Gültekin 2006; Gültekin 2011). Bunlardan en önemlileri üvez (*Sorbus domestica* L.), akçaağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*) ve kuş üvezi (*Sorbus aucuparia*)'dir (Gültekin ve Alan 2007; Gültekin 2011). Ülkemizde yetişen *Sorbus* türleri için "eyvaz", "ivaz" (İskilip-Çorum), "üvez yumurtu" (Niksar-Tokat), "ivez", "övez" gibi değişik isimler verildiği bildirilmiştir. *Sorbus domestica* L. ise "bahçe üvezi" adı ile anılmaktadır (Baytop 1994; Gültekin ve Gültekin 2006).

Sorbus torminalis (L.) Crantz. (akçaağaç yapraklı üvez), halk arasında, "geyicek elması", "dağ üvezi", "geyik elması", "gurmut", "yabani üvez", "böğürtlecen" veya

"börtlücan" olarak adlandırılmaktadır (Baytop 1994; Koçak 2006; Kültür 2007; Gültekin 2011). *S. torminalis*'in Avrupa'nın güney, batı ve ortasında, kuzeybatı Afrika'da, Kafkaslarda ve Güney batı Asya'nın batı kesimlerinde doğal olarak yetiştiği bildirilmektedir (Gabrelian 1972; Gökşin 1982; Koçak 2006; Kültür 2007; Nicolescu ve ark. 2009; Can 2012). *S. torminalis* ülkemizde ise Trakya, Marmara Bölgesi, Batı Karadeniz ile Anadoluda deniz seviyesinden 2200 m yüksekliğe kadar geniş bir bölgede yayılış göstermektedir. Güneydoğu Anadolu bölgesi hariç yurdumuzun tamamında yetişir. (Gökşin 1982; Can 2012). Akçaağaç yapraklı üvez ağacı üvez cinslerinin en fazla boylanan türüdür. Bu tür, 25 m boya ve 75 cm çapa ulaşabilen, beyaz çiçekli, görkemli bir orman ağacıdır. Meyve şekil olarak armut biçiminde (1-2 cm) olup, olgun meyveler, kırmızımtırak kahve renktedir (Şekil 2-13), (Gültekin 2011).

Şekil 2-13: *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. bitkisinin yaprak ve meyvelerinin genel görünüşü.

Çeşitli *Sorbus* türlerinin halk arasında diüretik, antiinflamatuar, antidiabetik, ishal önleyici, vazoprotektif, bronşları ve damarları genişletici özellikleri nedeniyle etnobotanik kullanımı olduğu bildirilmektedir (Hukkanen ve ark. 2006; Termentzi ve ark. 2006; Olszewska ve Michel 2009; Olszewska 2011b). *S. domestica* (L.) meyvelerinin birçok hastalık için iyileştirici özelliklerinin olduğu bildirilmektedir. *S. domestica* meyveleri ve yaprakları kabız etkilerinden dolayı, infusyon halinde (% 5)

dahilen ishalde kullanılmaktadır (Baytop 1999). Kırklareli ilinde, halk arasında, *S. torminalis*'in yaprakları kaynatılarak diabet hastalığı ve mide ağrıları tedavilerinde kullanıldığı bildirilmektedir (Kültür 2006). *Sorbus* meyveleri tıbbi amaçla direkt olarak tüketilebildiği gibi, kuru olarak içecek, tatlı ve reçel yapımında da kullanılmaktadır. Meyveler sorbitol, sorbik asid, askorbik asid, sitrik asid ve bol miktarda şeker içerir (Yılmaz 2010). *Sorbus torminalis* meyveleri önemli bir C vitamini kaynağı olduğu için, sonbaharda meyveler olgunlaştıktan sonra taze olarak veya reçel ve şurup olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Olszewska 2011a).

S. domestica meyvelerinin antioksidan kapasiteye sahip oldukları yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiş (Termentzi ve ark. 2006 ve 2008; Şen 2011), yüksek antioksidan aktiviteye sahip meyvelerin fenolik bileşenlerinin de fazla miktarda olduğu bildirilmiştir. Olgunlaşmamış *S. domestica* meyvelerinin kabuklarının çok fazla miktarda antioksidan madde içerdiği buna karşın iyi olgunlaşmış meyvelerin antioksidan aktivitesinin zayıf olduğu ve olgunlaşma ile fenolik bileşik miktarının azaldığı bildirilmektedir (Termentzi ve ark. 2006). Bu nedenle *S. domestica* meyvelerinin antioksidan ajan olarak bazı içeceklerde kullanıldığı da bildirilmektedir (Ölschläger ve ark. 2004).

S. domestica'dan farklı olarak diğer *Sorbus* türleri ile de antioksidan aktivite deneyleri yapılmıştır. *S. aucuparia*, *S. commixta, S. decora, S. gracilis, S. koehneana, S. pogonopetala, S. wilfordii* gibi *Sorbus* türlerinin yaprak ve çiçekli dallarından hazırlanan çeşitli ekstrelerin antioksidan aktiviteleri araştırıldığında, bitkinin yüksek antioksidan aktivite göstermesinin bitkinin aynı zamanda yüksek miktarda fenolik bileşik içermesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. İncelenen bu *Sorbus* türlerinin içinde *S. aucuparia*'nın çiçek salkımlarının en yüksek antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur (Olszewska ve ark. 2010; Olszewska ve ark. 2012).

S. aria (L.) Crantz (Olszewska ve Michel 2009) ve *S. aucuparia* (Olszewska ve Michel 2009; Olszewska 2011a)'nın çiçekli dalları, yaprakları ve meyveleri ile *S. domestica* (Termentzi ve ark. 2006; Şen 2011)'nın meyveleri ile yapılan diğer bazı araştırmalarda da, bu bitkilerin oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir.

S. torminalis yapraklarının içeriğinin araştırılması için yapılan bir çalışmada yaprakların tanen, elementel nikel, viteksin ve flavon-*O*-glikozidlerini içerdiği;

yaprakların eter ekstresinin *p*-kumarik asid ve kafeik asid, kloroform ekstresinin kersetin ve metanol ekstresinin kafeik asid, klorojenik asid, luteolin-7-*O*-glikozid ve apigenin-7-*O*-glikozidini içerdiği bildirilmiştir (Tsitsa-Tzardi ve ark. 1992). Daha sonraki yıllarda yapılan diğer bir araştırmada ise *S. torminalis*'in de diğer *Sorbus* türlerinde bulunduğu bildirilen flavonoidler, kafeoilkinik asid ve yoğun miktarda tanen gibi bilinen fitokimyasal bileşikleri içerdiği saptanmıştır (Olszewska 2011a). *S. torminalis* ve *S. aucuparia* çiçekli dal, yaprak ve meyvelerinin % 70 metanol ile hazırlanmış ekstrelerinin karşılaştırılmalı antioksidan aktivite deneylerinde DPPH ve ABTS radikal giderme aktiviteleri ve linoleik asid peroksidasyon testi araştırılmış ve total fenolik bileşenleri saptanmıştır. *S. torminalis* bitkisinin *S. aucuparia*'dan daha düşük antioksidan potansiyele sahip olduğu saptanmıştır (Olszewska 2011a).

Bu çalışmada İstanbul Belgrad ormanından toplanmış olan ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'nda 99256 numarası ile kayıtlı olan *S. torminalis* (L.) Crantz. meyvelerinden hazırlanacak sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerin total fenolik ve flavonoid bileşik miktarları saptanacak ve bu ekstrelerin antioksidan etkileri çeşitli antioksidan deneyleri ile belirlenmeye çalışılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bitki ekstrelerinin hazırlanmasında metanol (Merck 106008), aseton (Merck 100014) ve etil asetat (Merck 100864) kullanıldı.

Ekstrelerin total fenolik bileşiklerinin miktar tayininde sodyum karbonat (Na_2CO_3; Merck 106398) ve Folin Ciocalteu ayıracı kullanıldı. Folin Ciocalteau ayıracının hazırlanmasında sodyum wolframat ($Na_2WO_4.2H_2O$; Merck 106672), sodyum molibdat ($Na_2MoO_4.2H_2O$; Merck 386521), %85'lik fosforik asid (H_3PO_4; Merck 100564), derişik hidroklorik asid (HCl; Merck 100314), lityum sülfat (Li_2SO_4; Merck 105694), brom (Br_2; Merck 101945) ve standart eğri elde edilmesinde gallik asid (3,4,5-hidroksibenzoik asid; Sigma G7384) kullanıldı.

Total flavonoid miktar tayininde, sodyum nitrit ($NaNO_2$; Merck 106544), aluminyum klorür ($AlCl_3.6H_2O$; Merck 101083), sodyum hidroksit (NaOH; Merck 106462) ve standart eğri elde edilmesinde kateşin (Fluka 22110) kullanıldı.

DPPH radikal ($DPPH^{\bullet}$) giderme aktivitesi tayininde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH; Sigma D9132) ve metanol (Merck 106008) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak α-tokoferol (Sigma T3251) ve kersetin (3,3',4'-5,6-pentahidroksiflavon; Fluka 83370), α-tokoferolün ve kersetinin çözülmesi için de absolü etanol (Riedel 32221) kullanıldı.

ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) giderme aktivitesi tayininde, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-sülfonik asid) amonyum tuzu (ABTS; Fluka 11557), potasyum peroksidisülfat (Merck 105090) ve standart eğri elde edilmesinde 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asid (Troloks; Fluka 56510) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak α-tokoferol ve kersetin, α-tokoferolün ve kersetinin çözülmesi için de absolü etanol kullanıldı.

Ferri iyonu redükleme antioksidan gücü (FRAP) deneyinde; 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ; Merck 110238), sodyum asetat (Merck 106264), glasiyel asetik asid (Merck 100056) ve standart eğri elde edilmesinde demir sülfat ($FeSO_4.7H_2O$; Fluka 44970) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak α-tokoferol ve kersetin, α-tokoferolün ve kersetinin çözülmesi için de absolü etanol kullanıldı.

Süperoksit radikal giderme aktivitesi tayininde potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4; Merck 4873), sodyum fosfat dibazik ($Na_2HPO_4.2H_2O$; Sigma 30412) nitroblue tetrazolyum (NBT; Fluka 74030), fenazin metasülfat (PMS; Sigma P9625), indirgenmiş β-nikotinamid adenin dinükleotid (NADH; Sigma 43420) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kersetin ve çözülmesi içinde absolü etanol kullanıldı.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı (Arçelik), derin dondurucu (-20^{o}C) (Bosch), distile su cihazı (Labconco), ELISA mikro-plaka okuyucu (Eon Biotek), etüv (Heraeus), hassas terazi (AND HM 200), otomatik pipetler (Eppendorf), pH metre (Radiometer PHM 92), rota evaporatör (BUCHI R 210), Soxhlet aparatı, ultrasonik banyo (Elma S 10) ve vorteks (Velp scientifica).

3.3. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. (akçaağaç yapraklı üvez) meyveleri İstanbul Belgrat Ormanı Büyük Bent civarından toplandı. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Şükran Kültür tarafından teşhis edilen bitki örneği İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'na 99256 numarası ile kayıtlıdır.

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Ekstrelerin Hazırlanması

3.4.1.1. Sulu Ekstrenin Hazırlanması

S. torminalis meyveleri saplarından ayrıldıktan sonra gölgede kurutuldu. 15 g üvez meyvesi makasla küçük parçalara ayrıldı ve 250 mL'lik bir balona konuldu. Üzerine 150 mL distile su ilave edildikten sonra karışım geri çeviren soğutucu altında 3 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım 2 katlı tülbentten süzüldü ve rota evaporatörde suyu uçuruldu. Sulu ekstrenin ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) tayin edildi. Elde edilen ekstre daha sonra kullanılmak üzere ufak cam kaplara konularak -20°C'de saklandı.

3.4.1.2. Etil Asetatlı Ekstrenin Hazırlanması

Kurutulmuş 30 g *S. torminalis* meyvesi makasla küçük parçalara ayrıldı. Meyve parçaları 150 mL etil asetat ile yaklaşık olarak 24 saat Soxhlet aparatında reflüks edildi.

Elde edilen karışım rota evaporatöre konularak etil asetat ekstreden uzaklaştırıldı. Etil asetatlı ekstrenin ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) tayin edildi. Elde edilen ekstre daha sonra kullanılmak üzere ufak cam kaplara konularak -20°C'de saklandı.

3.4.1.3. Metanollü Ekstrenin Hazırlanması

Kurutulmuş 30 g *S. torminalis* meyvesi makasla küçük parçalara ayrıldı. Meyve parçaları 150 mL metanol ile yaklaşık olarak 24 saat Soxhlet aparatında reflüks edildi. Elde edilen karışım rota evaporatöre konularak metanol ekstreden uzaklaştırıldı. Metanollü ekstrenin, ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) tayin edildi. Elde edilen ekstre daha sonra kullanılmak üzere ufak cam kaplara konularak -20°C'de saklandı.

3.4.1.4. Asetonlu Ekstrenin Hazırlanması

Kurutulmuş 30 g *S. torminalis* meyvesi makasla küçük parçalara ayrıldı. Meyve parçaları 150 mL aseton ile yaklaşık olarak 24 saat Soxhlet aparatında reflüks edildi. Elde edilen karışım rota evaporatöre konularak aseton ekstreden uzaklaştırıldı. Asetonlu ekstrenin, ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) tayin edildi. Elde edilen ekstre daha sonra kullanılmak üzere ufak cam kaplara konularak -20°C' de saklandı.

3.4.2. Antioksidan Aktivite Deneyleri

3.4.2.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarı Slinkard ve Singleton (1977)'un metodunda bazı değişiklikler yapılarak, Folin-Ciocalteu ayıracı ile kolorimetrik olarak tayin edildi.

Kullanılan Çözeltiler

- **% 2'lik Na_2CO_3:** 2 g Na_2CO_3 distile su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.
- **Folin-Ciocalteu Ayıracı:** 1500 mL'lik balona 100 g $Na_2WO_4.2H_2O$, 25 g $Na_2MoO_4.2H_2O$, 700 mL distile su, 50 mL %85 H_3PO_4 ve 100 mL derişik HCl konularak geri soğutucu altında 10 saat kaynatıldı. Karışıma 150 g Li_2SO_4, 50 mL distile su ve birkaç damla Br_2 ilave edildi. Çeker ocak altında 15 dakika kaynatılarak soğutulduktan sonra hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı (Folin ve Ciocalteu 1927). Ayıraç kullanılmadan önce 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

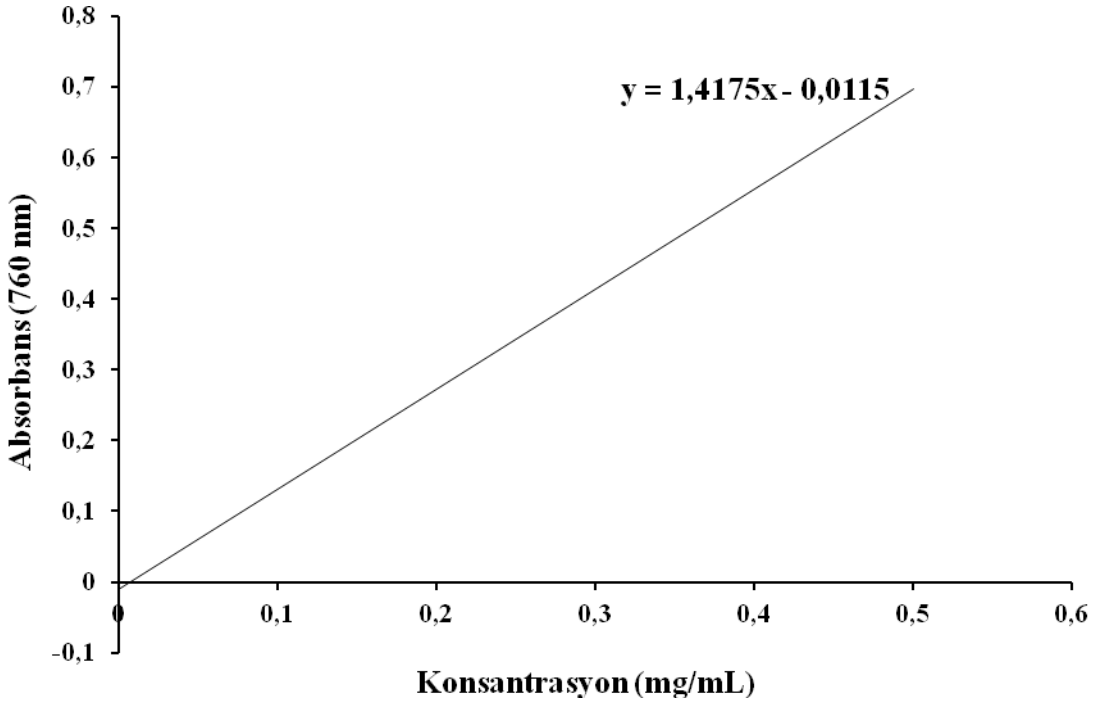
Deneyin Yapılışı

S. torminalis ekstreleri 40 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Uygun çözücülerle uygun oranlarda seyreltilerek (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) elde edilen çözeltilere deney uygulandı.

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden kuyucuklara 8 µL konularak üzerine 260 µL distile su ilave edildi. 8 µL Folin-Ciocalteu ayıracı ve 24 µL %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden ilave edildi. Mikro-plaka 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı, distile su içeren köre karşı, 760 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü. Sonuçlar gallik asid standart eğri denklemi kullanılarak "mg gallik asid ekivalanları/g meyve" olarak ifade edildi. Sonuçlar, ayrıca "mg gallik asid ekivalanları/g kuru meyve ağırlığı (DW)" olarak da hesaplandı. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları hesaplandı.

3.4.2.2. Gallik Asid Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Gallik asid standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce gallik asidin 5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL 0,0625 mg/mL ve 0,03125 mg/mL olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere modifiye edilmiş Folin-Ciocalteau deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 760 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü. Deney 10 kez tekrarlandı ve bulunan değerlere, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla gallik asid standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Gallik asid standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.4.2.3. Total Flavonoid Miktar Tayini

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin total flavonoid miktarları Kim ve arkadaşları (2003) tarafından tanımlanan standart kolorimetrik ölçümde bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi.

Kullanılan Çözeltiler

- **% 5'lik $NaNO_2$:** 5 g $NaNO_2$ distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **% 10'luk $AlCl_3$:** 10 g $AlCl_3$ distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **1 M NaOH:** 4 g NaOH distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

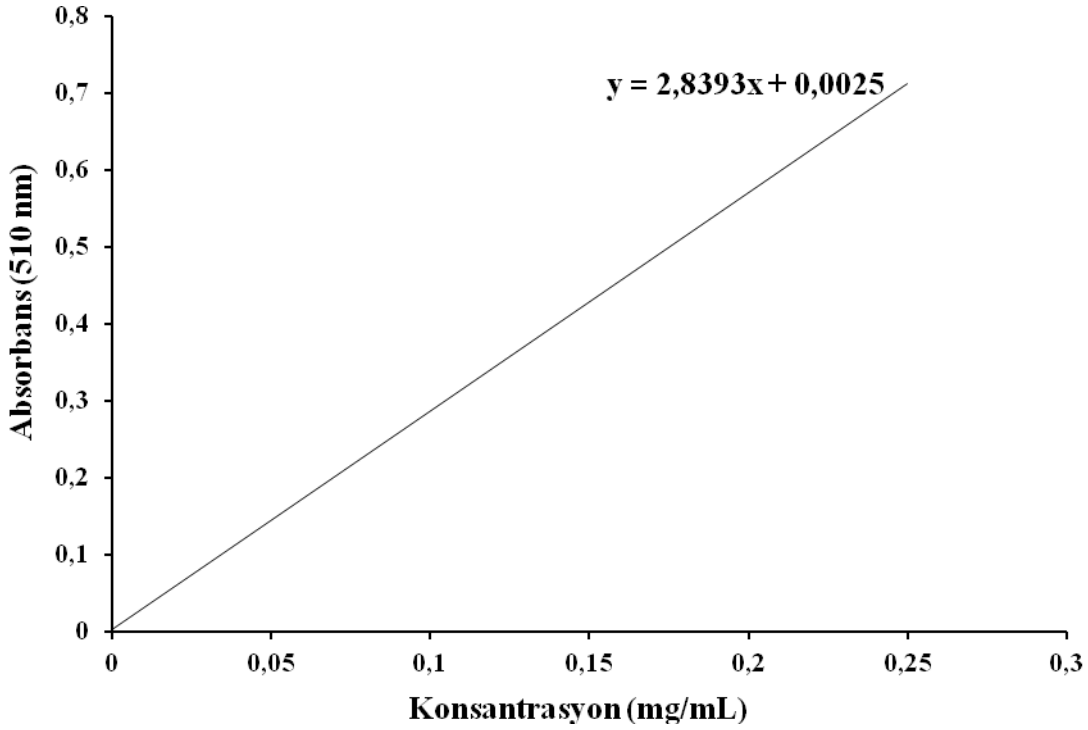
Deneyin Yapılışı

S. torminalis'in ekstreleri 40 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Uygun çözücülerle seyreltilen çözeltilerle (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) deney yapıldı.

25 µL ekstre veya standart olarak kullanılan kateşin çözeltileri üzerine 125 µL distile su eklendi. 7,5 µL % 5'lik $NaNO_2$ ilave edildikten 5 dakika sonra 15 µL % 10'luk $AlCl_3$ ilave edildi ve karışım 5 dakika bekletildikten sonra 50 µL 1 M NaOH ilave edildi. Karışım üzerine 27,5 µL distile su ilave edilerek karıştırıldı. Oluşan rengin absorbansı 510 nm'de ayıraç körüne (distile su) karşı ölçüldü. Sonuçlar kateşin standart eğri denklemi kullanılarak mg kateşin ekivalanları/g meyve olarak ifade edildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve aritmetik ortalamaları hesaplandı.

3.4.2.4. Kateşin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Kateşinin 2,5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL ve 0,015625 mg/mL olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere deney uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 510 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü. Deney 10 kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla kateşin standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.4.3. ABTS Radikal Katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) Giderme Aktivitesi Tayini

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) giderme aktiviteleri Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metotta bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi.

Kullanılan Çözeltiler

- **Potasyum Peroksidisülfat Çözeltisi (4,9 mM):** 0,132 g potasyum peroksidisülfat distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **$ABTS^{\bullet+}$ Stok Çözeltisi (7 mM):** 0,384 g ABTS 50 mL 4,9 mM potasyum peroksidisülfat ve 50 mL distile su ile çözüldü. Koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlamak için oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletildi.
- **$ABTS^{\bullet+}$ Çalışma Çözeltisi:** Deney günü $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisinin, 734 nm'deki absorbansı 0,70 (± 0,02) olacak şekilde, % 96'lık etanol ile seyreltilmesi ile hazırlandı.
- **Stok Troloks Çözeltisi (10 mM):** 25 mg Troloks 10 mL Na-K fosfat tamponu (pH 7.4) ile çözüldü.
- **75 mM Na-K Fosfat Tamponu (pH 7.4):** 2,04135 g KH_2PO_4 ve 8,5176 g $NaHPO_4$ 600 mL distile suda çözüldü. pH'sı N HCl ve N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Sulu ve etil asetatlı ekstrelerden 20 mg/mL olacak şekilde, asetonlu ekstreden 40 mg/mL, metanollü ekstreden 80 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve uygun çözücülerle ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Ekstreler seyreltilerek sulu ve etil asetatlı ekstrelerin 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1,25 mg/mL konsantrasyonlarına, asetonlu ekstrenin 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL ve 2,5 mg/mL konsantrasyonlarına, metanollü ekstrenin 80 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarına deney 3 kez uygulandı.

5 µL ekstre üzerine 245 µL $ABTS^{\bullet+}$ çalışma çözeltisi ilave edilmesi ile renkte meydana gelen azalma 734 nm'de 6. dakikada köre karşı (etanol) ölçüldü. Pozitif kontrol olarak α-tokoferol (0,08 - 1,25 mg/mL) ve kersetin (0,02 - 0,3 mg/mL) ve

negatif kontrol olarak, ekstre veya standart çözeltiler yerine aynı miktarda % 96'lık etanol kullanıldı.

ABTS radikal katyonu giderme aktivitesi aşağıdaki Denklem 3-1'e göre hesaplandı.

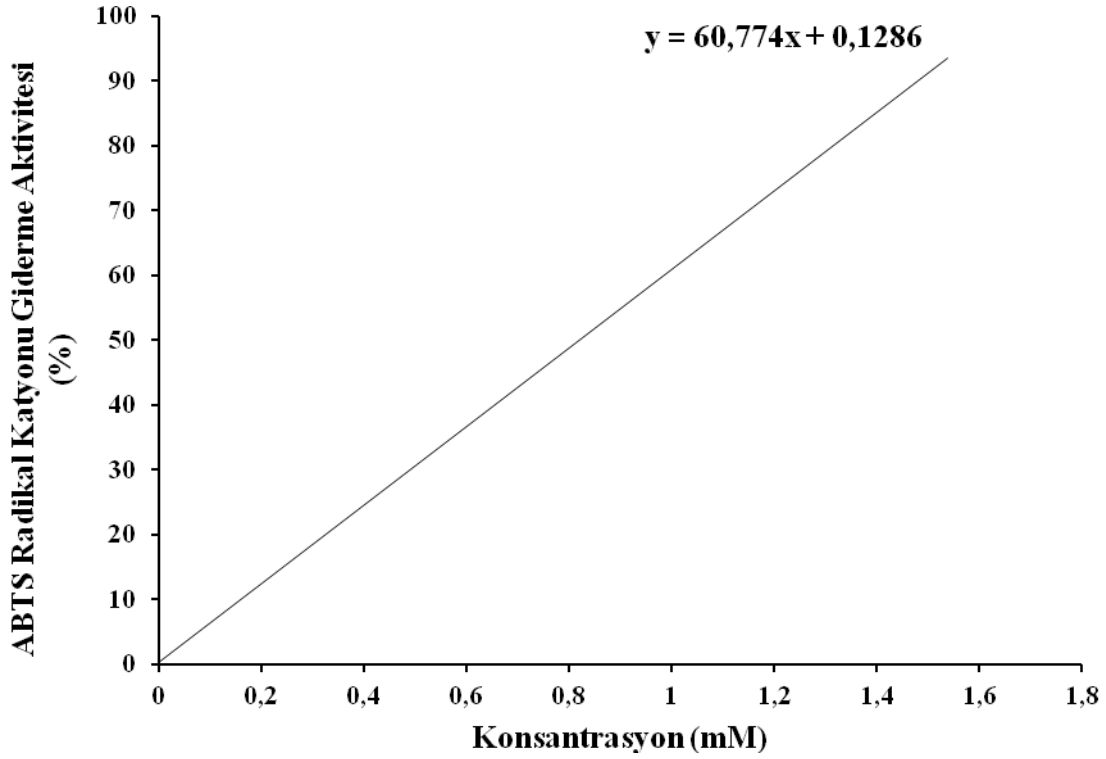
$$\text{ABTS radikal katyonu giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 734 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 734 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100 \qquad (3\text{-}1)$$

EC_{50} değeri (% 50 $ABTS^{\bullet+}$'nin giderilmesini sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu), absise antioksidan miktarı, ordinata inhibisyon yüzdeleri verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin linear kısmından elde edilen regresyon denkleminden hesaplandı.

Denklemden elde edilen inhibisyon yüzdelerinin Troloks standart eğrisine ait değerlerle karşılaştırılmasıyla, 1 mM Troloks'un gösterdiği inhibisyon yüzdesine eşdeğer inhibisyon yüzdesi göstermesi için gerekli olan *S. torminalis* meyve ekstresinin konsantrasyonu hesaplandı ve $ABTS_{TEAC}$ değeri olarak ifade edildi.

3.4.3.1. $ABTS^{\bullet+}$ Giderme Aktivitesi İçin Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Troloks'un 10 mM'lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 75 mM'lık Na-K fosfat tamponu (pH 7.4) ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM ve 0,125 mM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere deney uygulandıktan sonra absorbansta meydana gelen azalma ELISA mikro-plaka okuyucu ile 734 nm'de 6. dakikada ölçüldü ve Troloks'un $ABTS^{\bullet+}$ giderici aktivitesi yüzdeleri hesaplandı. Deney 10 kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla Troloks standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi için Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.4.4. DPPH Radikal ($DPPH^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi Tayini

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin DPPH radikal ($DPPH^{\bullet}$) giderme aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafından geliştirilen metotta bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi.

Kullanılan Çözeltiler

- **1 mM $DPPH^{\bullet}$ Stok Çözeltisi:** 0,0059 g $DPPH^{\bullet}$ metanolde çözüldü. Hacim 15 mL'ye metanol ile tamamlandı.
- **0,1 mM $DPPH^{\bullet}$ Çalışma Çözeltisi:** 1 mM $DPPH^{\bullet}$ stok çözeltisi 10 kez seyreltilerek çalışma çözeltisi elde edildi.

Deneyin Yapılışı

Sulu, etil asetatlı ve asetonlu ekstreler 20 mg/mL olacak şekilde, metanollü ekstre 80 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve uygun çözücülerle ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Ekstreler seyreltilerek sulu, etil asetatlı

ve asetonlu ekstrelerinin 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1,25 mg/mL konsantrasyonlarına, metanollü ekstrenin 80 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarına deney uygulandı.

10 µL ekstre üzerine 240 µL 0,1 mM $DPPH^{\bullet}$ çalışma çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta bekletildi. Absorbanslar ELISA mikro-plaka okuyucuda 517 nm'de köre (metanol) karşı okundu. Pozitif kontrolde ekstrenin yerine standart olarak α-tokoferol ve kersetin, negatif kontrolde ise çözücü kullanıldı. Deney üç kez tekrarlandı ve sonuçların aritmetik ortalamaları alındı.

$DPPH^{\bullet}$ radikal giderme aktivitesi aşağıdaki Denklem 3-2'ye göre hesaplandı.

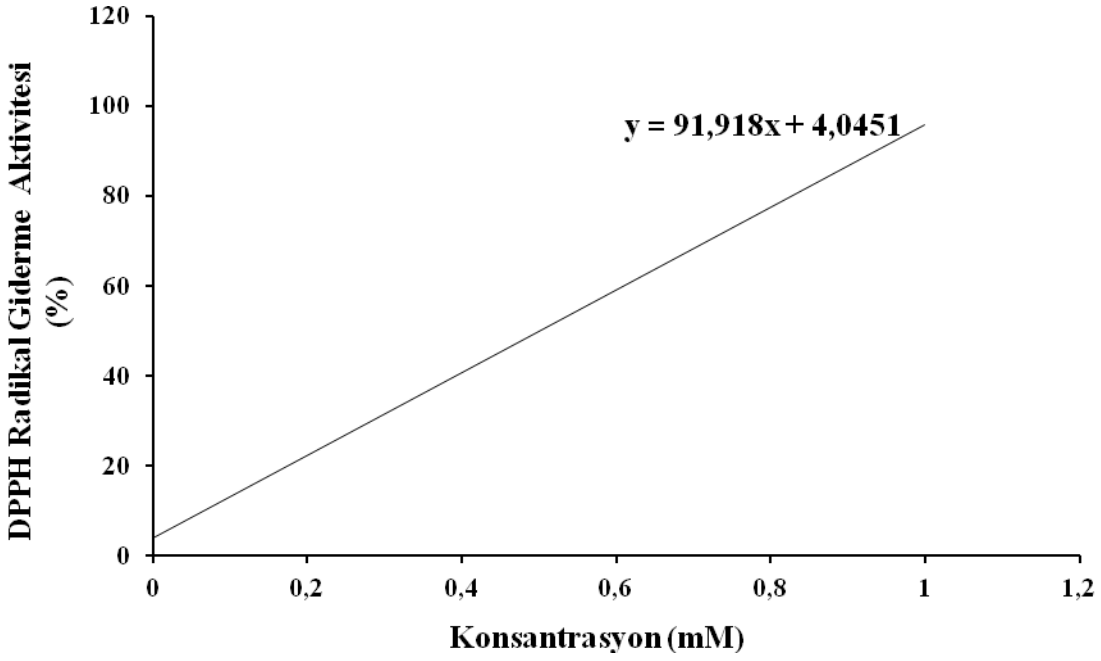
$$\text{DPPH radikal giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 517 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 517 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100 \qquad (3\text{-}2)$$

Antioksidanın EC_{50} (% 50 DPPH radikali giderilmesini sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu), değerini hesaplamak için absise antioksidan miktarı, ordinata % DPPH radikali giderme aktivitesi verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kısmından regresyon denklemi elde edildi.

Denklemden elde edilen inhibisyon yüzdeleri Troloks standart eğrisine ait değerlerle karşılaştırılmasıyla, 1 mM Troloks'un gösterdiği inhibisyon yüzdesine eşdeğer inhibisyon yüzdesi göstermesi için gerekli olan *S. torminalis* meyve ekstresinin konsantrasyonu hesaplandı ve $DPPH_{TEAC}$ değeri olarak ifade edildi.

3.4.4.1. $DPPH^{\bullet}$ Giderme Aktivitesi İçin Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Troloks'un 10 mM'lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 75 mM'lık Na-K fosfat tamponu (pH 7.4) ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM ve 0,0625 mM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere DPPH radikal giderme aktivitesi deneyi uygulandıktan sonra absorbanslar 517 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü ve Troloks'un DPPH radikal giderme aktivitesi yüzdeleri hesaplandı. Deney 10 kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla Troloks standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: DPPH$^{\bullet}$ giderme aktivitesi için Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.4.5. Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü (FRAP) Tayini

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin ferri iyonu redükleme antioksidan gücü (FRAP) Benzie ve Strain (1996) geliştirdiği metodun mikro-plaka okuyucuya uyarlanmasıyla tayin edilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler

- **40 mM HCl :** 4 mL 1 M HCl distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **10 mM TPTZ Çözeltisi:** 31,2 mg TPTZ, 40 mM HCl ile çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.
- **20 mM $FeCl_3$ Çözeltisi:** 54 mg $FeCl_3.6H_2O$ distile su ile çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.
- **0,3 M Asetat Tamponu (pH 3.6):** 3,1 g sodyum asetat 800 mL distile su ile çözüldü ve 16 mL glasiyel asetik asid ilave edildikten sonra pH'sı 3.6 olarak ayarlanıp distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- **Stok Demir Sülfat Çözeltisi (1,5 mM):** 0,0417 g $FeSO_4.7H_2O$ distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

- **FRAP Ayıracı:** 2,5 mL 10 mM TPTZ çözeltisi, 2,5 mL 20 mM $FeCl_3$ çözeltisi ve 25 mL 0,3 M asetat tamponunun karıştırılması ile deneyden önce taze olarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

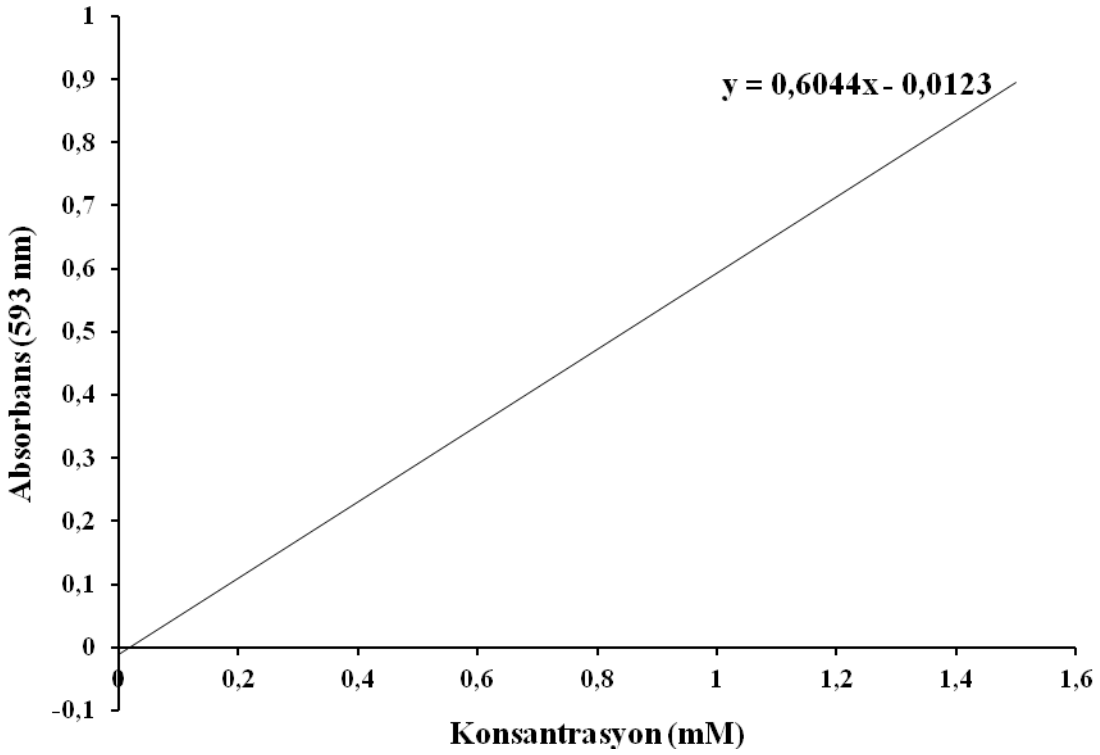
Sulu ekstre 10 mg/mL, etil asetatlı ve asetonlu ekstreler 40 mg/mL, metanollü ekstre 100 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve uygun çözücülerde ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Ekstreler seyreltilerek sulu ekstrenin asetonlu ve etil asetatlı ekstrenin 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL ve 2,5 mg/mL konsantrasyonlarına, metanollü ekstrenin 100 mg/mL, 80 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarına deney uygulandı

10 μL ekstre üzerine 20 μL çözücü ilave edildikten sonra ELISA mikro-plaka okuyucuda 10 dakika 37^{o}C'de inkübe edildi. Kuyucuklara 270 μL FRAP ayıracı eklendi ve 4. dakikadaki absorbans artışı 593 nm'de köre karşı ölçüldü. Kör olarak örnek yerine aynı miktarda çözücü kullanıldı. Pozitif kontrol olarak α-tokoferol ve kersetine aynı deney uygulandı.

Ekstrelerin A_{593nm} değeri, $FeSO_4.7H_2O$ ile hazırlanan standart eğrisine ait A_{593nm} değerleri ile karşılaştırıldı ve hesaplanan FRAP değeri (mM Fe^{2+}), 1 mM Fe (III)'ün Fe (II)'e indirgenmesi olarak ifade edildi. Deneyler üç kez tekrarlandı ve ortalamaları alındı.

3.4.5.1. $FeSO_4.7H_2O$ Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

$FeSO_4$ standart eğri denkleminin elde edilmesi için stok $FeSO_4.7H_2O$ çözeltisi (1,5 mM) distile su ile seyreltilerek konsantrasyonları 1,2 mM, 1 mM, 0,8 mM, 0,4 mM ve 0,2 mM olan standart çözeltiler hazırlandı. Standart çözeltilere FRAP deneyi uygulandı ve oluşan renklerin absorbansları 4. dakikada 593 nm'de ölçüldü. Deneyler beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla, regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizildi (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: $FeSO_4.7H_2O$ standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.4.6. Süperoksit Radikal Giderme Aktivitesi Tayini

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin süperoksit radikal giderme aktivitesi nitroblue tetrazolyumun indirgenmesi metoduna göre tayin edildi (Nishikimi ve ark. 1972).

Kullanılan Çözeltiler

- **1 M Stok Na-K Fosfat Tamponu (pH 7.4):** 1 M KH_2PO_4 ve 1 M $Na_2HPO_4.2H_2O$ çözeltileri distile su ile hazırlandıktan sonra pH metre ile uygun pH'a getirildi. Bu stok tampon 10 kez seyreltilerek kullanıldı.
- **468 µM NADH**: 0,0066 g NADH 100 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) çözülerek 20 mL'ye tamamlandı.
- **150 µM Nitroblue Tetrazolyum (NBT):** 0,0024 g NBT 100 mM Na-K fosfat tamponunda (pH 7.4) çözülerek 20 mL'ye tamamlandı.
- **60 µM Fenazin-Meta Sülfat (PMS):** 0,0045 g PMS 100 mM Na-K fosfat tamponunda (pH 7.4) çözülerek 250 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Sulu ve etil asetatlı ekstreler 20 mg/mL, asetonlu ekstre 40 mg/mL, metanollü ekstre 100 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve uygun çözücülerde ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Ekstreler seyreltilerek sulu ve etil asetatlı ekstrelerin 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL ve 2,5 mg/mL konsantrasyonlarına, asetonlu ekstrenin 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarına, metanollü ekstrenin 100 mg/mL, 80 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarına deney uygulandı.

Kuyucuklara 10 μL ekstre üzerine 100 μL NADH ve 100 μL NBT eklendikten sonra 10 μL PMS eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. Karışım 25°C'de 5 dk ELISA mikro-plaka okuyucuda inkübe edildikten sonra absorbanslar 560 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak ekstre yerine aynı miktarda çözücü ve PMS yerine 10 μL fosfat tamponu (pH 7.4) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kersetine aynı metod uygulandı. Negatif kontrol olarak ise ekstre yerine 10 μL çözücü kullanılarak. Deney üç kez tekrarlandı.

Süperoksit radikal giderme aktivitesi aşağıdaki Denkelem 3-3'e göre hesaplandı.

$$\text{Süperoksit radikal giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 560 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 560 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100 \qquad (3\text{-}3)$$

EC_{50} değeri, (% 50 süperoksit radikalinin giderilmesini sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu) absise antioksidan miktarı, ordinata inhibisyon yüzdeleri verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin linear kısmından elde edilen regresyon denkleminden hesaplandı.

3.5. İstatiksel Değerlendirme

S. torminalis meyve ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin araştırılmasında kullanılan bütün deneyler üçer kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde, NCSS programı kullanılarak, Student's t testinden yararlanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada *S. torminalis* meyvesinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin total fenolik ve flavonoid bileşik miktarları tayin edilerek ekstrelerin serbest radikal giderici etkileri, indirgeyici güçleri ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir.

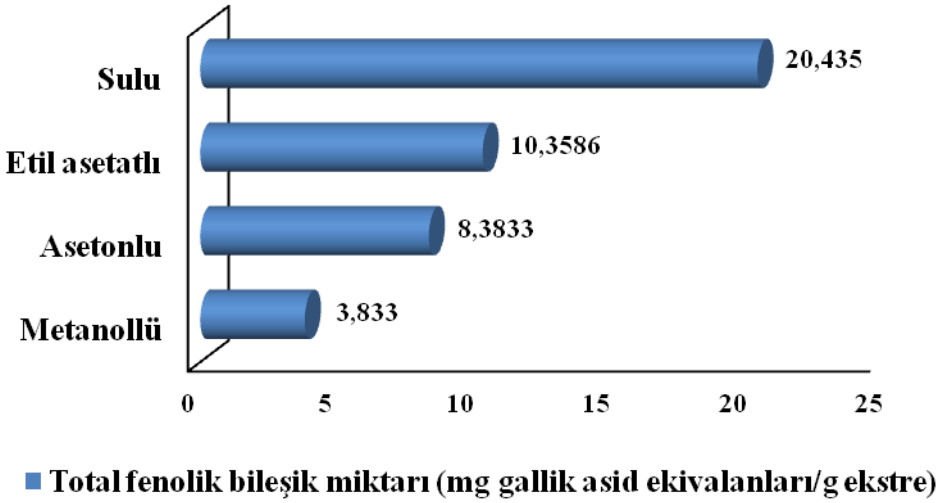
S. torminalis meyvelerinden elde edilen sulu, etil asetatlı, metanol ve asetonlu ekstrelerin total ekstre edilebilen bileşik miktarları (EC) sırasıyla 0,42g/g, 0,029 g/g, 0,228 g/g ve 0,055 g/g meyve olarak bulundu (Tablo 4-1). Sulu ve metanollü ekstrelerden elde edilen EC miktarlarının etil asetat ve asetonlu ekstrelere göre daha fazla olduğu gözlemlendi.

4.1. Ekstrelerin Total Fenolik Bileşik Miktarı

Ekstrelerin total fenolik bileşik miktarları (PC), "mg gallik asid ekivalanları/g ekstre" olarak Şekil 4-1 ve Tablo 4-1'de gösterildi. Etil asetatlı ve asetonlu ekstrelerdeki total fenolik bileşiklerin miktarının, yaklaşık olarak, aynı miktarda olduğu, buna karşın sulu ekstredeki total fenolik bileşik miktarlarının diğer ekstrelere göre fazla olduğu bulundu ($p < 0,05$). Metanollü ekstredeki total fenolik bileşik miktarının ise diğer esktrelere göre çok düşük olduğu saptandı ($p < 0,05$).

Ekstrelerin total fenolik bileşik miktarları "mg gallik asid ekivalanları/g DW" olarak Tablo 4-1'de gösterildi. Ekstrelerin PC/EC değerleri (%) hesaplandığında, sulu ve etil asetatlı ekstrelerin diğer ekstrelere göre daha yüksek PC/EC değerine sahip olduğu görüldü (Tablo 4-1).

Ekstreler "mg gallik asid ekivalanları/g ekstre" total fenolik bileşik miktarı bakımından sulu > etil asetatlı ≥ asetonlu > metanollü olarak; "mg gallik asid ekivalanları/g DW" total fenolik bileşik miktarı bakımından sulu > metanollü > asetonlu > etil asetatlı olarak sıralandı (Tablo 4-1).

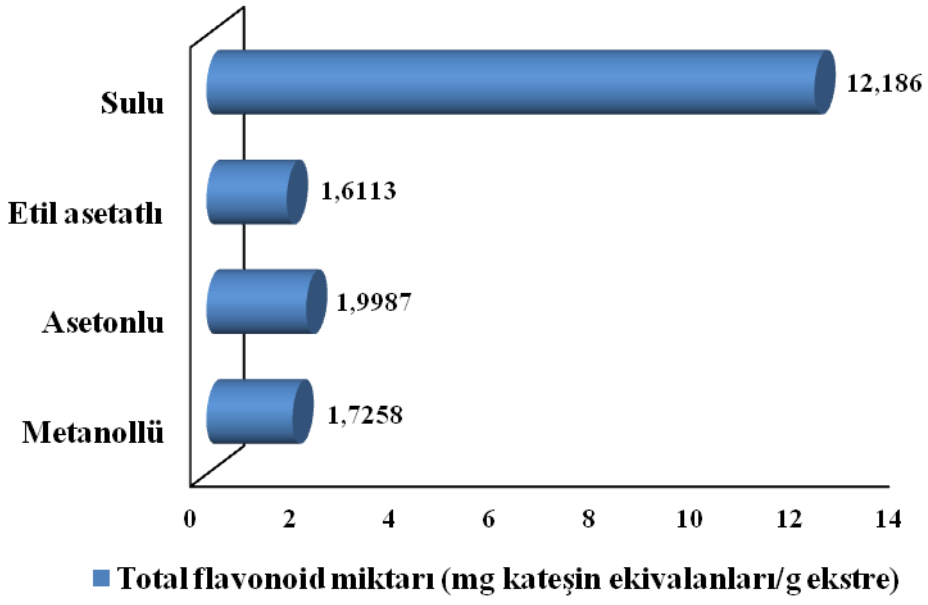


Şekil 4-1: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları.

4.2. Ekstrelerin Flavonoid Miktarı

Ekstrelerin total flavonoid miktarları "mg kateşin ekivalanları/g ekstre" olarak hesaplandı (Tablo 4-1).

Sulu ekstrenin diğer ekstrelere göre oldukça fazla miktarda flavonoid bileşik içerdiği gözlemlendi. Diğer üç ekstre arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$) ve bu ekstreler total flavonoid miktarları bakımından asetonlu $\geq$ metanollü $\geq$ etil asetatlı olarak sıralandı (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin total flavonoid miktarları.

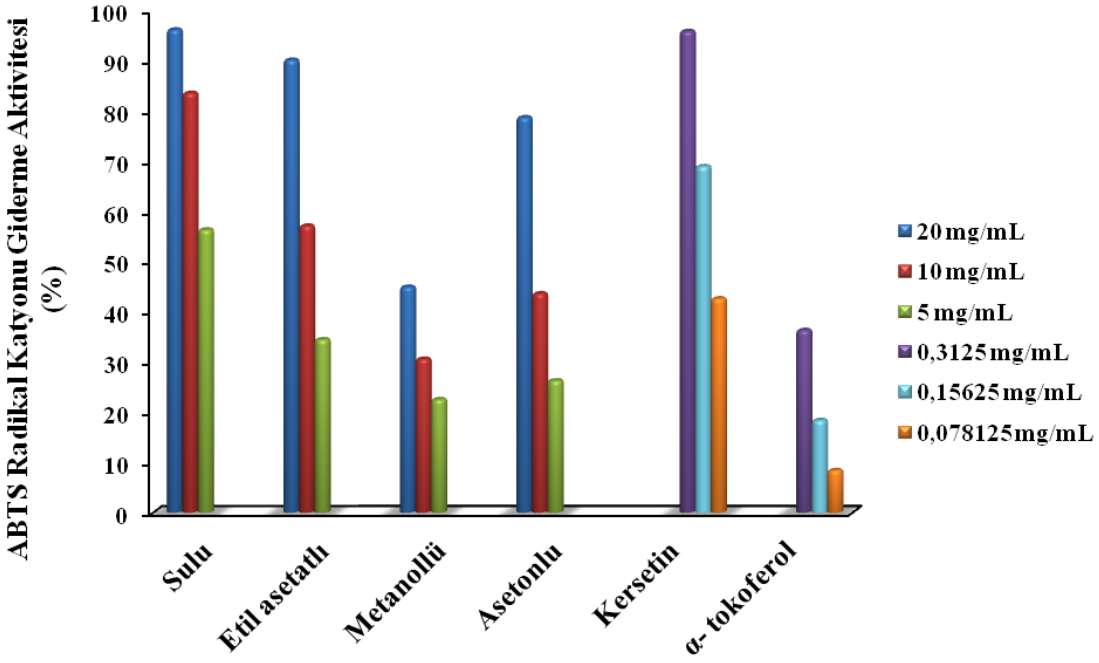
Tablo 4-1: *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin total ekstre edilebilen bileşik (EC), total fenolik bileşik (PC; gallik asid ekivalanı olarak) ve total flavonoid (kateşin ekivalanı olarak) miktarları

Ekstre	EC (g/g DW)	Total fenolik bileşik (mg /g ekstre) [A]	Total fenolik bileşik mg/g (DW)	PC/EC (%)	Total flavonoid miktarı (mg/g ekstre) [B]
Sulu	0,420	20,44 ± 0,910[a]	8,58 ± 0,382[a]	2,044	12,19 ± 2,005[a]
Etil asetat	0,029	10,36 ± 1,547[b]	0,30 ± 0,045[b]	1,036	1,61 ± 0,410[b]
Metanol	0,228	3,83 ± 0,164[c]	0,87 ± 0,037[c]	0,383	1,73 ± 0,612[b]
Asetonlu	0,055	8,38 ± 1,151[b]	0,43 ± 0,057[d]	0,791	2,00 ± 0,214[b]

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.
DW: Kuru meyve ağırlığı
a,b,c: Aynı sütun içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,05$).
A: mg gallik asid ekivalanları/g ekstre
B: mg kateşin ekivalanları/g ekstre

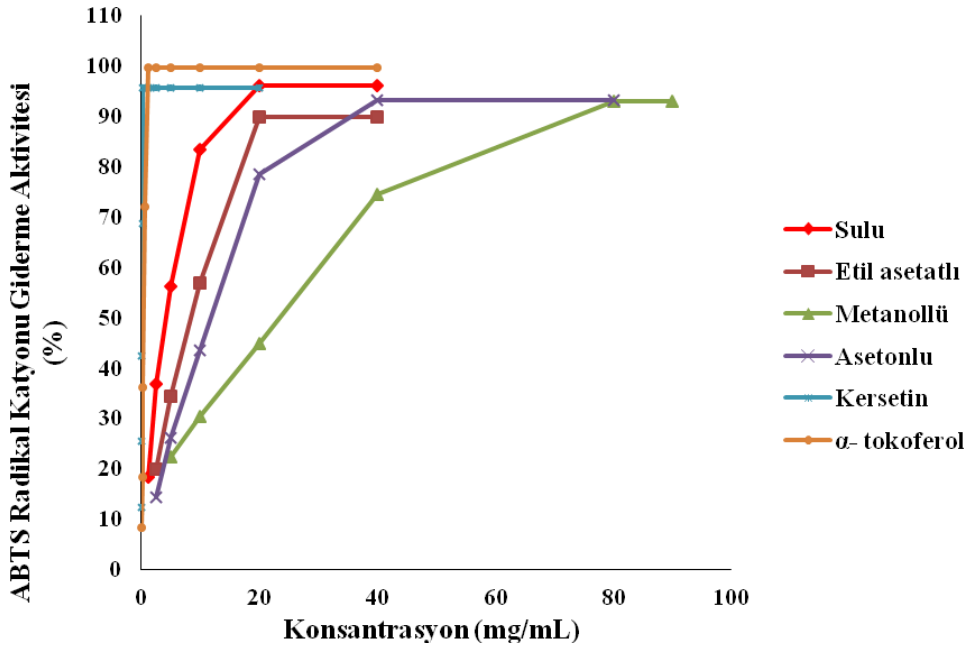
4.3. Ekstrelerin ABTS Radikal Katyonu ($ABTS^{\bullet+}$) Giderme Aktivitesi

Ekstrelerin konsantrasyona bağlı $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri % olarak Şekil 4-3'te gösterildi.



Şekil 4-3: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlardaki $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri.

Düşük EC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği için, pozitif kontrollerin ve ekstrelerin $EC_{50\ ABTS}$ değerleri kersetin < α-tokoferol < sulu ekstre < etil asetatlı ekstre < asetonlu ekstre < metanollü ekstre yönünde sıralandı (Şekil 4-4 ve Tablo 4-2).



Şekil 4-4: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri.

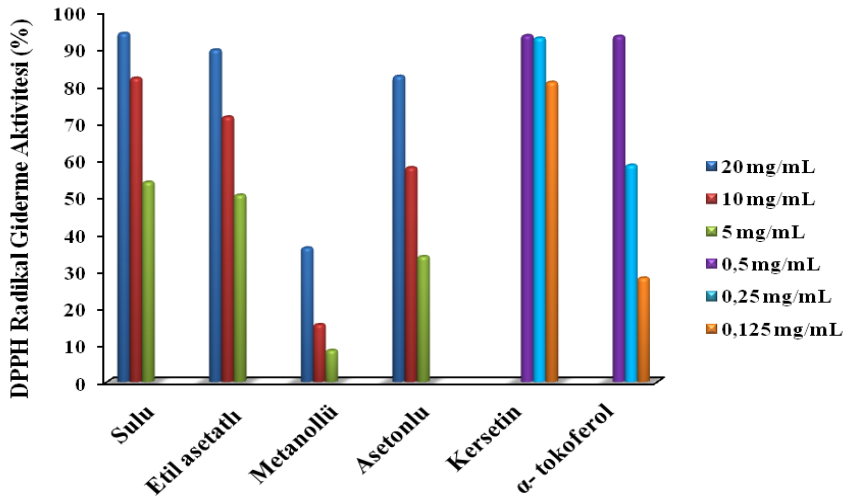
Ekstrelerin ABTS radikal katyonu giderme aktiviteleri TEAC değeri olarak değerlendirildi. 1 TEAC 1 mM Troloks'un gösterdiği $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesine ekivalan, ekstrelerin veya pozitif kontrolün konsantrasyonu olarak ifade edildi. TEAC değeri, bileşiklerin hidrojen veya elektron verici etkisini yansıttığı için yüksek TEAC değeri yüksek antioksidan aktivitenin göstergesidir.

Ekstrelerin 10 mg/mL konsantrasyonlarındaki $ABTS_{TEAC}$ değerleri karşılaştırıldığında tüm ekstrelerin anlamlı olarak birbirinden farklı $ABTS_{TEAC}$ değerlerine sahip olduğu bulundu ($p < 0,05$). Ekstrelerin $ABTS_{TEAC}$ değerleri, sulu > etil asetatlı > asetonlu > metanollü olarak sıralandı (Tablo 4-3).

Ekstrelerin $ABTS_{TEAC}$ değerleri ile pozitif kontrol olarak kullanılan α-tokoferolün 1,25 mg/mL'deki ve kersetinin 0,3125 mg/mL'deki konsantrasyonlarındaki $ABTS_{TEAC}$ değerleri ile karşılaştırıldığında, bütün ekstrelerin pozitif kontrollerden daha düşük $ABTS_{TEAC}$ değerlerine sahip oldukları görüldü (Tablo 4-3).

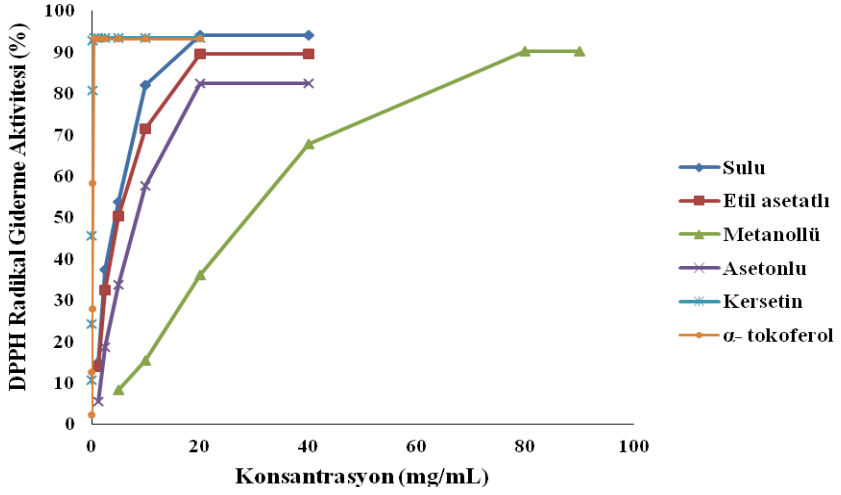
4.4. Ekstrelerin DPPH Radikal (DPPH•) Giderme Aktivitesi

Ekstrelerin konsantrasyona bağlı DPPH• giderme aktiviteleri % olarak Şekil 4-5'te gösterildi.



Şekil 4-5: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlardaki DPPH• giderme aktiviteleri.

$EC_{50\ DPPH}$ değeri %50 DPPH radikali giderilmesini sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu olmak üzere düşük EC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir. Pozitif kontrollerin ve ekstrelerin $EC_{50\ DPPH}$ değerleri (Şekil 4-6), kersetin < α- tokoferol < sulu ekstre ≤ etil asetatlı ekstre < asetonlu ekstre < metanollü ekstre olarak sıralandı (Tablo 4-2).



Şekil 4-6: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin DPPH radikal giderme aktiviteleri.

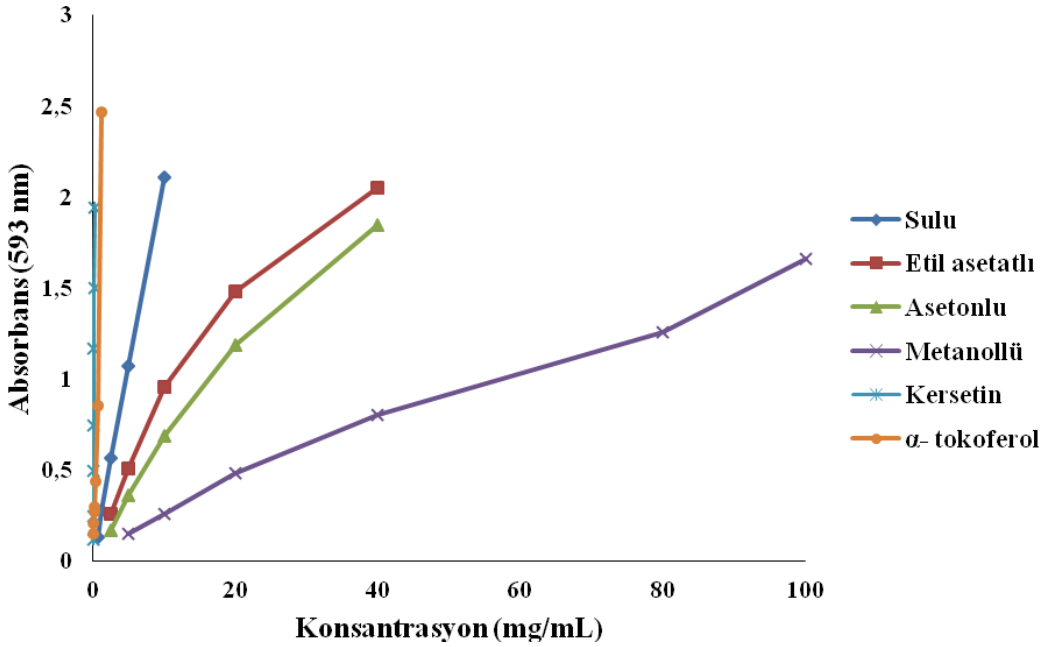
Ekstrelerin DPPH radikal (DPPH$^{\bullet}$) giderme aktivitesi TEAC değeri olarak değerlendirildi. 1 TEAC, 1 mM Troloks'un gösterdiği DPPH radikal giderme aktivitesine ekivalan, ekstrelerin veya pozitif kontrolün konsantrasyonu olarak ifade edildi.

Ekstrelerin 10 mg/mL konsantrasyonlarındaki $DPPH_{TEAC}$ değerleri karşılaştırıldığında tüm ekstrelerin anlamlı olarak birbirinden farklı $DPPH_{TEAC}$ değerlerine sahip olduğu bulundu ($p < 0,05$). Ekstreler $DPPH_{TEAC}$ değerleri bakımından, sulu ekstre > etil asetatlı ekstre > asetonlu ekstre > metanollü ekstre olarak sıralandı (Tablo 4-3).

Ekstrelerin $DPPH_{TEAC}$ değerleri ile pozitif kontrol olarak kullanılan α-tokoferolün 0,5 mg/mL'deki ve kersetinin 0,25 mg/mL'deki konsantrasyonlarındaki $DPPH_{TEAC}$ değerleri karşılaştırıldığında, bütün ekstrelerin pozitif kontrollerden daha düşük $DPPH_{TEAC}$ değerlerine sahip oldukları görüldü (Tablo 4-3).

4.5. Ekstrelerin Ferri İyonu Redükleme Antioksidan Gücü (FRAP)

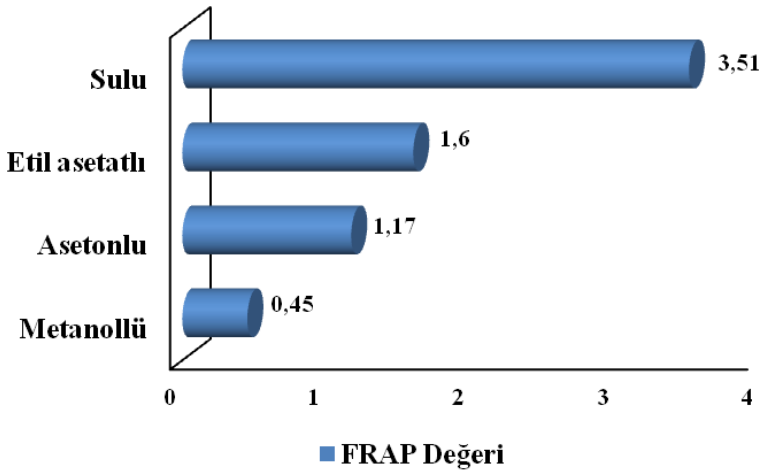
Ekstrelerin ve pozitif kontrollerin ferri iyonu redükleme antioksidan güçleri Şekil 4-7'de gösterildi. Ekstrelerin ferri iyonu redükleme antioksidan gücünün konsantrasyona bağlı olarak arttığı saptandı.



Şekil 4-7: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin ferri iyonu redükleme antioksidan güçleri.

Ekstrelerin indirgeme gücü FRAP değeri (mM Fe^{2+}) olarak ifade edildi. Yüksek FRAP değeri yüksek indirgeme gücünün göstergesidir ve indirgeme gücü yüksek olan bileşikler serbest radikallere elektron vererek ve onları zararsız hale getirerek radikal reaksiyonlarını sonlandırabilirler.

Ekstrelerin 10 mg/mL FRAP değerleri karşılaştırıldığında tüm ekstrelerin anlamlı olarak birbirinden farklı FRAP değerlerine sahip olduğu bulundu ($p < 0,05$). Ekstrelerin FRAP değerleri karşılaştırıldığında ekstreler indirme gücü bakımından sulu ekstre > etil asetatlı ekstre > asetonlu ekstre > metanollü ekstre olarak sıralandı (Şekil 4-8 ve Tablo 4.3).

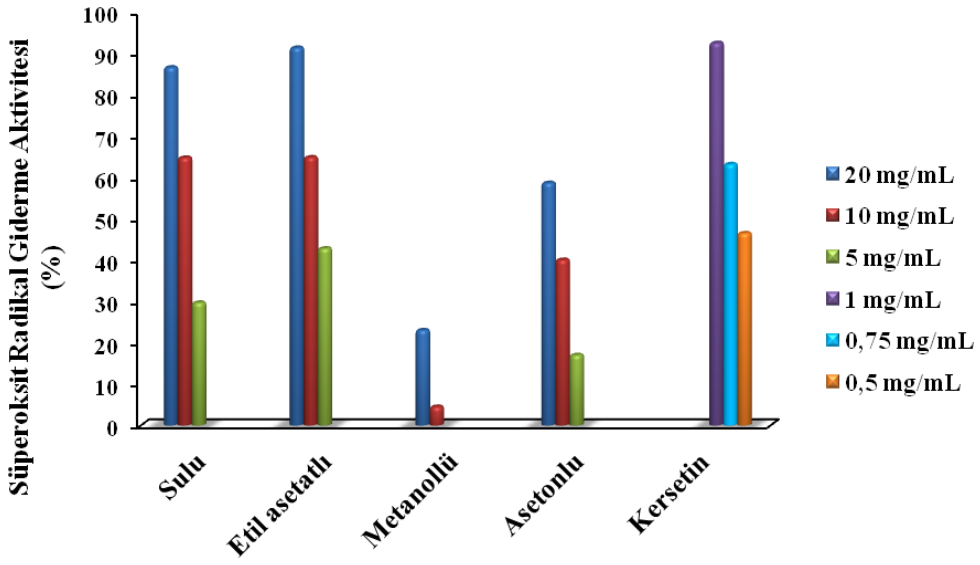


Şekil 4-8: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin 10 mg/mL'deki FRAP değerleri (mM Fe^{2+}).

Ekstrelerin FRAP değerleri pozitif kontrol olarak kullanılan α-tokoferolün 1,25 mg/mL konsantrasyondaki FRAP değeri ve kersetinin 0,25 mg/mL konsantrasyonundaki FRAP değeri ile karşılaştırıldığında sulu ekstrenin kersetinden daha büyük FRAP değerine sahip olduğu görüldü (Tablo 4-3).

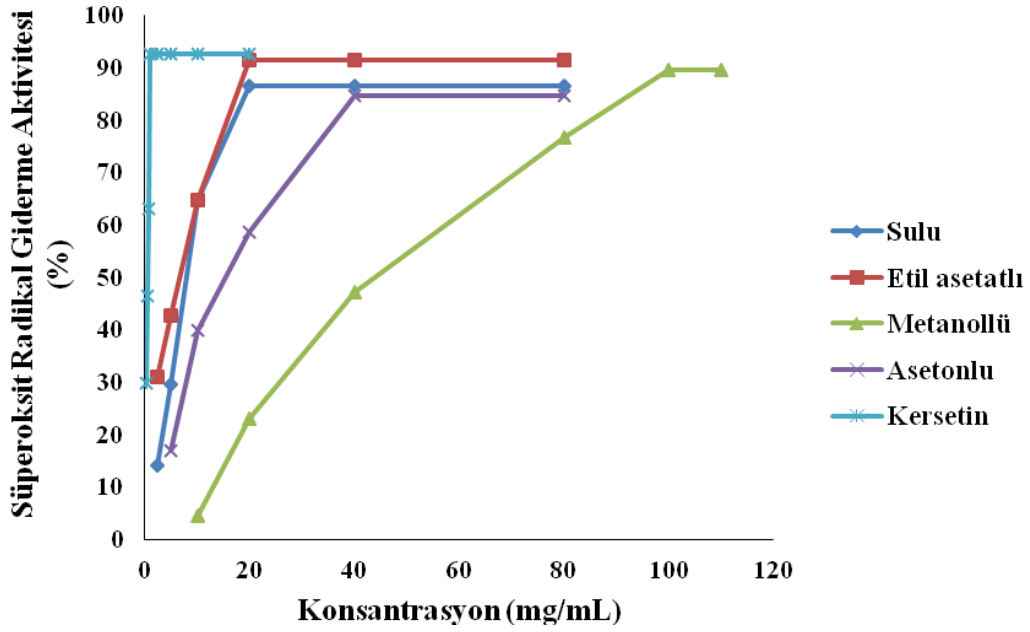
4.6. Ekstrelerin Süperoksit Radikal Giderme Aktivitesi

Ekstrelerin konsantrasyona bağlı süperoksit radikal giderme aktiviteleri Şekil 4-9'da gösterildi. Ekstrelerin süperoksit radikal giderme aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı saptandı.



Şekil 4-9: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve kersetinin farklı konsantrasyonlardaki süperoksit radikal giderme aktiviteleri.

Ekstrelerin $EC_{50\ SOD}$ değerleri karşılaştırıldığında etil asetatlı ekstrenin en düşük EC_{50} değerine sahip olduğu saptandı. Düşük EC_{50} değerinin yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği göz önüne alınarak ekstreler ve pozitif kontrol; kersetin < etil asetatlı ekstre ≤ sulu ekstre < asetonlu ekstre < metanollü ekstre olarak sıralandı (Şekil 4-10), (Tablo 4-2).



Şekil 4-10: *S. torminalis* meyve ekstrelerinin ve kersetinin süperoksit radikal giderme aktiviteleri.

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, asetonlu ve metanollü ekstrelerinin $EC_{50\ ABTS}$, $EC_{50\ DPPH}$ ve $EC_{50\ SOD}$ değerleri Tablo 4-2'de özet olarak gösterilmektedir.

Tablo 4-2: *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, asetonlu, metanollü ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin $EC_{50\ ABTS}$, $EC_{50\ DPPH}$ ve $EC_{50\ SOD}$ değerleri

Ekstre ve Standartlar	$EC_{50\ ABTS}$ (mg/mL)	$EC_{50\ DPPH}$ (mg/mL)	$EC_{50\ SOD}$ (mg/mL)
Sulu Ekstre	$5,30 \pm 0,166^{a}$	$5,69 \pm 0,364^{a}$	$9,01 \pm 1,025^{a}$
Etil Asetatlı Ekstre	$9,30 \pm 0,449^{b}$	$6,08 \pm 1,263^{a}$	$7,41 \pm 0,887^{a}$
Asetonlu Ekstre	$13,23 \pm 0,341^{c}$	$10,21 \pm 0,230^{b}$	$18,64 \pm 1,162^{b}$
Metanollü Ekstre	$27,53 \pm 4,097^{d}$	$32,31 \pm 2,615^{c}$	$48,47 \pm 4,779^{c}$
Kersetin	$0,12 \pm 0,001^{e}$	$0,07 \pm 0,001^{d}$	$0,53 \pm 0,037^{d}$
α- tokoferol	$0,49 \pm 0,035^{f}$	$0,24 \pm 0,018^{e}$	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.
a, b, c, d, e, f : Aynı sütun içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,05$).

S. torminalis meyvelerinin sulu, etil asetatlı, asetonlu ve metanollü ekstrelerinin $TEAC_{ABTS}$, $TEAC_{DPPH}$ ve FRAP değerleri Tablo 4-3'te özet olarak gösterilmektedir.

Tablo 4-3: *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, asetonlu, metanollü ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin $TEAC_{ABTS}$, $TEAC_{DPPH}$ ve FRAP değerleri

Ekstre ve Standartlar	$TEAC_{ABTS}$ (mM)	$TEAC_{DPPH}$ (mM)	FRAP (mM Fe^{2+})
Sulu Ekstre	$1,37 \pm 0,051^{a}$	$0,85 \pm 0,019^{a}$	$3,51 \pm 0,060^{a}$
Etil Asetatlı Ekstre	$0,94 \pm 0,0470^{b}$	$0,73 \pm 0,033^{b}$	$1,60 \pm 0,060^{b}$
Asetonlu Ekstre	$0,71 \pm 0,091^{c}$	$0,59 \pm 0,015^{c}$	$1,17 \pm 0,027^{c}$
Metanollü Ekstre	$0,50 \pm 0,084^{d}$	$0,19 \pm 0,052^{d}$	$0,45 \pm 0,020^{d}$
Kersetin	$1,57 \pm 0,033^{*e}$	$0,97 \pm 0,002^{**e}$	$3,24 \pm 0,136^{**e}$
α- tokoferol	$1,64 \pm 0,004^{***f}$	$0,97 \pm 0,009^{****f}$	$4,10 \pm 0,240^{***f}$

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.
TEAC değerleri mM Trolox ekivalanı olarak ifade edildi.
a, b, c, d, e, f: Aynı sütun içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,05$).
*: Kersetinin 0,3125 mg/mL'deki $TEAC_{ABTS}$ değeri
**: Kersetinin 0,25 mg/mL'deki $TEAC_{DPPH}$ ve FRAP değerleri
***: α- tokoferolün 1,25 mg/mL'deki $TEAC_{ABTS}$ ve FRAP değerleri
****: α- tokoferolün 0,5 mg/mL'deki $TEAC_{DPPH}$ değeri

5. TARTIŞMA

Epidomiyolojik çalışmalar yüksek miktarda fenolik bileşikler içeren meyve, sebze ve diğer bitkisel ürünlerce zengin diyetin insan sağlığı ve hastalıkları önleme bakımından önemli olduğunu göstermiştir. Fenolik bileşiklerin, ROS'ları nötralize ederek antioksidan etki gösterdikleri ve bunun sonucu olarak insan sağlığı için yararlı oldukları ve hastalıkları önlemede etkili oldukları yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Oksidatif stres şartlarında, ROS önemli biyomoleküllerle reaksiyona girebilir ve hücresel zarara, ateroskleroz, koroner hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif beyin rahatsızlıkları gibi kronik hastalıklara neden olabilir (Olszewska 2011a).

Oksidasyonu önlemek için gıdalara ilave edilen BHT, BHA gibi sentetik antioksidanların toksik ve karsinojenik etkilerinin olabileceği bildirildiği için (Sherwin 1990; Wichi 1988), bitkilerde bulunan tabii antioksidanların saptanması ve izolasyonu çalışmaları son 10 yılda büyük önem kazanmıştır. Tıbbi bitkiler, meyveler, sebzeler, kuru yemişler, baharatlar, ağaç materyalleri ve bitki tohumları gibi pek çok bitkisel materyal antioksidan aktivite ve fenolik bileşenler açısından incelenmiş ve bunların çok azının fenolik bileşik açısından zengin olduğu saptanmıştır (Olszewska ve Michel 2009). Bu nedenle bitkilerin antioksidan aktivitelerinin araştırılmasına olan ilgi halen devam etmektedir.

Bitkilerde doğal antioksidanlar arasında önemli rol oynayan polifenol içerikler bitki türü, tarımsal işlem, ışık, iklim, hasat zamanı ve depolama şartları gibi pek çok dış etkenden etkilenir (Heimler ve ark. 2007). Yiyecek veya farmasötik preparatlarda katkı maddesi olarak kullanılacak olan antioksidanların uygun şekilde elde edilebilmeleri ve kullanılacakları zamana kadar aktivitelerini kaybetmeden uygun şartlarda depo edilmeleri gerektiği bildirilmektedir (Olszewska ve ark. 2012). Bu nedenle çalışmamızda çeşitli çözücülerle elde edilen ekstreler kuruluğa kadar uçurulduktan sonra kullanılmıştır. Bitkilerde antioksidan kapasitenin tayininde hala çözümlenmemiş problemler olduğu bildirilmektedir. Farklı laboratuvarlarda kullanılan deneylerin çeşitliliğinden dolayı, elde edilen sonuçların tam olarak mukayese edilmesinin güç olduğu belirtilmektedir (Prior ve ark. 2005).

Sorbus cinsi ile yapılan daha önceki çalışmalarda, bazı *Sorbus* türlerinin güçlü antioksidan kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Hukkanen 2006; Termentezi 2006;

Olszewska 2011a; Şen 2011). Olszewska (2011a) tarafından yapılan bir çalışmada *S. torminalis* ve *S. aucuparia* meyvelerinin %70 metanollü ekstrelerinin antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS radikal giderme aktiviteleri, linoleik asid peroksidasyon testi metodları ile araştırılmış ve total fenolik bileşenlerinin miktarı saptanmıştır. *S. torminalis* bitkisinin *S. aucuparia*'dan daha düşük antioksidan potansiyele sahip olduğu bulunmuştur.

S. torminalis'in sulu, etil asetatlı ve asetonlu ekstrelerinin antioksidan aktivite yönünden incelenmesi ilk kez tarafımızdan yapılmıştır. Bu çalışmamızda *S.torminalis* meyvesinden elde edilen sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerin anioksidan kapasitelerinin tayininde, ELISA mikro-plaka okuyucu kullanılarak, ET sınıfına giren; ferri iyonu redükleyici antioksidan güç (FRAP), DPPH radikal giderme aktivitesi, total fenolik bileşik miktar tayini ve HAT sınıfına giren; ABTS radikal katyonu giderme aktivitesi, süperoksit radikal giderme aktivitesi metodları kullanılmıştır. Çeşitli kaynaklardaki total antioksidan aktiviteyi tayin etmek için tek bir aktivite deneyi yeterli olmayacağı için birden fazla antioksidan aktivite tayin metodunun kullanılması gerektiği literatürde bildirilmektedir (Prior ve ark. 2005). Bu nedenle çalışmamızda 6 farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi kullanılarak *S. torminalis* meyvelerinin antioksidan aktivitesi tayin edildi.

Çalışmamızda total fenolik bileşik miktarı, flavonoid, proantosiyanid ve kafeoilkinik asid içeren *Sorbus* dokularındaki ana fenolik metabolitlerin total düzeyini saptamak için en uygun yöntem olduğu bildirilen (Olszewska ve ark. 2012) Folin-Ciocalteu metoduna göre tayin edildi. Gallik asid ekivalanı olarak ifade edilen ekstrelerin total fenolik bileşik miktarları ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücülere göre farklılıklar gösterdiği bulundu. Total fenolik bileşik miktarının en yüksek sulu ve etil asetatlı ekstrelerde olduğu gözlemlendi ve total fenolik bileşik miktarı mg gallik asid ekivalanı/g DW olarak hesaplandığı zaman ise, sadece sulu ekstrenin total fenolik bileşik miktarının diğer çözücülerinkine göre çok yüksek olduğu bulundu. Etil asetatla elde edilen total ekstre edilebilen bileşik miktarının verimi çok küçük olduğu halde, PC/EC değeri metanollü ve asetonlu ekstreye göre daha fazla olduğu saptandı. Aynı sonuç, Ozsoy ve ark. (2009)'larının *Amaranthus lividus* (L.) bitkisinin antioksidan aktivite tayini deneylerinde de bulunmuş ve etil asetatın bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstre elde edilmesinde, metanol ve asetondan daha etkili olduğu ileri sürülmüştür.

Kähkönen ve arkadaşlarının (1999) Finlandiya'da yetişen yabani kuş üvezi ile yaptıkları bir çalışmada, total fenolik bileşiğinin 18,7 mg gallik asid ekivalanı/g DW kadar yüksek olduğu bildirilmiştir. *S. acuparia* ile yapılan diğer bir çalışmada (Olszewska 2011a), çiçekli dallar ve yapraklarda yüksek total fenolik bileşik miktarı saptanmış, meyvelerde ise oldukça düşük miktarda total fenolik bileşik bulunmuştur. Aynı çalışmada *S. torminalis* çiçekli dal, yaprak ve meyvelerinde *S. acuparia*'dan daha düşük total fenolik bileşik miktarlarının olduğu bildirilmiştir. *S. torminalis*'in de diğer *Sorbus* türlerinde bulunduğu bildirilen flavonoidler, kafeoilkinik asid ve yoğun miktarda tanen gibi bilinen fitokimyasal bileşikleri içerdiği saptanmıştır (Olszewska 2011a).

Bitki droglarından flavonoidlerin ekstraksiyonu için çözücünün seçilmesi, özellikle bitkide bulunan flavonoidlerin polaritesine bağlıdır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999). Ekstrelerin total flavonoid miktarları karşılaştırıldığında, kullanılan çözücülerden en yüksek polariteye sahip olan su ile elde edilen ekstrenin en yüksek total flavonoid değerine sahip olduğu görüldü. Etil asetat, metanol ve asetonun yakın polarite değerlerine (4,3-6,6) sahip olduğunu göz önünde bulundurulursa, bu ekstrelerin flavonoid miktarlarının sulu ekstreden oldukça düşük olmasının ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamasının bu çözücülerin meyvedeki flavonoidleri elde etmek için uygun polaritede olmadığı ile ilişkilendirebilir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, bazı flavonoidlerin süperoksit ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını, lipid peroksil radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Bilaloğlu ve Harmandar 1999). *S. torminalis*'in bir seri metil oksillenmiş flavonoller ve flavonlar içermesine rağmen, antioksidan aktivitesinin düşük olduğu, *S. acuparia*'da ise kersetin bulunduğu için akvitenin daha yüksek olduğu ileri sürülmektedir (Olszewska 2011a). Kersetinin de içinde bulunduğu flavonoller grubu flavonoidlerin moleküler özellikleri nedeni ile flavanollerden (kateşinler) daha etkili antioksidanlar olduğu ileri sürülmektedir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

Total fenolik bileşik miktar tayini yöntemi ile diğer elektron transferine dayanan metodlar arasında mükemmel doğrusal korelasyon olduğu belirlenmiştir (Lussignoli ve ark. 1999). Çalışmamızda da ekstrelerin total fenolik bileşik miktarları ile $TEAC_{DPPH}$ ve FRAP değerleri birbiriyle uyumlu olarak en yüksek değerin sulu ekstrede olduğu görüldü.

Serteser ve ark. (2009) Türkiye'de yetişen *S. torminalis*'inde aralarında bulunduğu 38 farklı bitki ile DPPH radikal giderme aktivitesi, Fe^{2+} kelatlama aktivitesi, H_2O_2 inhibisyon aktivitesi metodlarını kullanarak yaptıkları antioksidan aktivite araştırmasında, *S. torminalis*'in metanollü ekstresinin DPPH radikal giderme aktivitesi bakımından en düşük 5 bitki arasında olduğunu bulmuşlar; radikal giderme, antioksidan aktivite ve total fenolik bileşik miktarı arasında farkedilebilir bir korelasyon olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Olszewska (2011b) tarafından yapılan çalışmada *S. torminalis* meyvesinin %70 metanolik ekstresinin DPPH ve ABTS radikal giderme aktiviteleri EC_{50} değeri ve Troloks ekivalanı şeklinde saptanmıştır. Bulgularımız bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Her iki çalışmada da kullanılan metanollü ekstrenin, pozitif kontrol olarak kullanılan kersetine oranla, ancak çok yüksek konsantrasyonlarda % 50 inhibisyon sağlayabildiği bulunmuştur.

Ekstrelerin $TEAC_{ABTS}$, $TEAC_{DPPH}$ ve FRAP değerleri birbiriyle uyumlu olarak sulu ekstre > etil asetatlı ekstre > asetonlu ekstre > metanollü ekstre olarak, $EC_{50\ DPPH}$ ve $EC_{50\ SOD}$ değerleri ise sulu ekstre = etil asetatlı ekstre < asetonlu ekstre < metanollü ekstre olarak sıralandı. Bu sonuçların ekstrelerin total fenolik bileşik miktarlarıyla da uyumlu olduğu saptandı.

Çalışmamızda sulu ve etil asetatlı ekstrelerin $EC_{50\ DPPH}$ değerleri bakımından istatiksel olarak benzer bulunmaları, metodun dezavantajı olarak görülen, DPPH'in organik ortamlarda iyi çözülmesine karşın sulu ortamlarda çözülmemesine bağlı olabileceği bildirilmektedir. Literatürlerde çözücünün su içeriğinin antioksidan kapasiteyi azaltan önemli bir sınırlama olduğu da belirtilmektedir (Arnao 2000; Magalhães ve ark. 2008).

Sonuç olarak, *S. torminalis* meyvelerinin sulu, etil asetatlı, metanollü ve asetonlu ekstrelerinin antioksidan aktivitesi incelendiğinde en yüksek antioksidan aktiviteyi sulu ekstrenin gösterdiği bulundu. Ekstrelerin antioksidan aktivite gösterebilmeleri için önemli bir mekanizma olan, elektron verebilme yeteneğinin göstergesi olarak kabul edilen FRAP değerleri karşılaştırıldığında en yüksek değere sulu ekstrenin sahip olduğu görüldü. Etil asetatlı ekstrenin $EC_{50\ DPPH}$ ve $EC_{50\ SOD}$ değerlerinin sulu ekstrenin değerleri ile benzerlik gösterdiği saptandı. Bunun sonucu olarak *S.*

torminalis antioksidanlarını konsantre etmek için en uygun çözücünün su ve etil asetat olduğu söylenebilir.

Kullandığımız metodlarda sulu ekstrenin diğer ekstrelere oranla daha iyi değerlere sahip olması, meyvenin içindeki antioksidan maddelerin diyetle organizmaya alınabilmesi açısından önemli ve pozitif bir bulgudur. Çalışmalarımız sonucunda bütün ekstrelerin farklı derecelerde antioksidan aktivite göstermelerine rağmen hiçbir ekstrenin pozitif kontroller kadar etkin radikal giderme yeteneğine sahip olmadıkları saptandı. Deneylerimizde pozitif kontrol olarak kullanılan kersetin ve α-tokoferol ekstrelerden daha aktif antioksidan aktivite göstermelerine rağmen, bu pozitif kontrollerin saf şekilde ve aşırı miktarda insanlarda kullanılmaları sonucu pro-oksidan ve toksik etkileri olacağı için, doğal antioksidan kaynağı olan *S. torminalis* meyvelerinin kullanımının insanlar için daha yararlı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

Ademoğlu, E. (2010). Hücrenin yapı ve fonksiyonları. İçinde F. Gürdol, E. Ademoğlu (Eds.), *Biyokimya Gözden Geçirilmiş 2. Baskı*. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul; 17-19.

Ak, T. (2006). Curcumin'in Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

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

Akpoyraz, M. ve Durak, İ. (1995). Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal of the Faculty of Medicine)*, ***48***, 253-262.

Aksoy, Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutationun rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri,* ***22***, 442-448.

Arnao, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, ***11(11)***, 419-421.

Arthur, M.S.P., Bentley, I.S., Tanner, A.R., Saunders, P.K., Millward-Sadler, G.H. ve Wright, R. (1985). Oxygen derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology*, ***89***, 1114 -1122.

Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, ***75(2)***, 199–212.

Badarinath, A.V., RAo, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, S., Rajan, T.V.S. ve Gnanaprakash, K. (2010). A review on *in-vitro* antioxidant methods: Comparisions, correlations and considerations. *International Journal of Pharmaceutical Technology and Research,* ***10***, 1276-1285.

Baskin, S.I. ve Salem, H. (1997). *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*. Washington DC: Taylor and Francis.

Başoğlu, F. (2006). *Yemeklik Yağ Teknolojileri*. Nobel Yayın Dağıtım, 1. Baskı, Ankara. 343.

Baytop, T. (1994). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Türk Dil Kurumu Yayınları No 578, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara.

Baytop, T. (1999). *Türkiyede Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün),* Nobel Tıp Kitabevleri LTD, ŞTİ, İstanbul.

Becker, L.B., Vanden Hoek, T.L., Shao, Z.H., Li, C.Q. ve Schumacker, P.T. (1999). Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *The American Journal of Physiology*, ***277***, H2240- H2246.

Benzie, I.F.F. (1996). An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry*, ***29***, 111-116.

Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, ***239***, 70-76.

Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M. (1999). *Flavonoidler*. Aktif Yayınevi, İstanbul.

Bishop, M.L. ve Janet, L.P. (1996). *Free Radicals in Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations.* 3rd ed. Philadelphia, New York; 765-777.

Bohr, V.A. ve Dianov, G.L. (1999). Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie*, ***81(1-2)***, 155-160.

Bolzán, D.A, Bianchi, M.S. ve Bianchi, N.O. (1997). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: Influence of sex, age and cigarette smoking. *Clinical Biochemistry*, ***30***, 449-454.

Boveris, A. (1994). Biochemistry of free radicals: From electrons to tissues. *Medicina (B Aires)*, ***58(4)***, 350-356.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. ve Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT, Food Science and Technology*, ***28***, 25-30.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, ***56***, 317-333.

Brody, E.J. (1988). The destructive potential of free oxygen radicals. *International Herald Tribune.* April 2: p 4-5. Ref: Kozluca, O. (1993). Serbest radikaller ve kanser. *Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri*, ***4***, 422-425.

Bubenik, G.A., Blask, D.E., Brown, G. M., Maestroni, G.J., Pang, S.F., Reiter R.J., Viswanathan, M. ve Zisapel, N. (1998). Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biological Signals and Receptors*, ***7***, 195-219.

Cadenas, E. ve Packer, L. (1996). *Handbook of Antioxidants*, New York: Marcel & Dekker.

Can, E. (2012). Bazı Üvez (Sorbus spp) Türleri Tohumlarının Çimlendirilmesinde Katlama ve Fitohormonların Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Carr, A.C., Zhu, B.Z. ve Frei, B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*, ***87***, 349-354.

Castro, L. ve Freeman, B.A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, ***17(2)***, 161-165.

Cemeroğlu, B. (2004). *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt.* Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara; 77-88.

Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, ***49(3)***, 481- 493.

Chen, H. ve Tappel, A.L. (1996). Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by $CBrCl_3$ in liver, lung, kidney, heart, and spleen. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, ***44(3)***, 854-858.

Coşkun, F. (2006). Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, ***2***, 27-33. (Erişim Tarihi: 03.05.2013). http://www.teknolojikarastirmalar.com/pdf/tr/02_010206_3_coskun_tr.pdf

Cross, C.E. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, ***107***, 526-545.

Çakmakçı, S. ve Çelik, I. (2000). *Gıda Katkı Maddeleri*. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Notu, Erzurum.

Çavdar, C., Sifil, A. ve Çamsarı, T. (1997). Rekatif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, ***3-4***, 92-95.

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

Çelik, H. (2005). Malaria (sıtma) Hastalarında Oksidatif Stres ve Mononükleer Lenfosit DNA Hasarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

DelMaestro, R.F., Thaw, H.H., Bjork, J., Planker, M. ve Arfors, K.E. (1980). Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum, **492***, 43-57.

Di Mascio, P. Murphy, M.E. ve Sies, H. (1991). Antioxidant defense system: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition, **53***, 194-200.

Diplock, A. (1998). Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe Concise Monograph Series*, Belgium; 59

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. ***82***, 47-95.

Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. ve James, W.P.T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*, ***2***, 51-62.

Dündar, Y. ve Aslan, R. (2000). *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 29, 1. Basım, Uyum Ajans, Ankara.

Evans, P. ve Halliwell, B. (2001). Micronutrients: Oxidant/antioxidant status. *The British Journal of Nutrition, **85(Suppl 2)***, S67-S74.

Evelson, P., Ordóňez, C.P., Liesuy, S. ve Boveris, A. (1997). Oxidative stress and *in vivo* chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *Journal Photochemistry-Photobiology-B Biology, **38(2-3)***, 215-219.

Fang, Y.-Z., Yang, S. ve Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition, **18***, 872-879.

Fenton, H.J.H. (1876). On a new reaction of tartaric acid. *Chemical News, **33***, 190.

Flora, S.J. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology, **53***, 1-2.

Folin, O. ve Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *The Journal of Biological Chemistry, **73***, 627–650.

Forbes, M., Zilliken, F., Roberts, G. ve György, P. (1958). A new antioxidant from yeast. Isolation and chemical studies. *Journal of the American Chemical Society, **80***, 385–389.

Formica, J.V. ve Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, ***33***, 1061-1080.

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, ***893***, 13-18.

Gabrielian, E.T. (1972). *Sorbus* L. İçinde P.H. Davis, *Flora of Turkey and East Aegean Island* (Ed. Vol 4), Edinburgh Univ. Press.; 147-156.

Garewal, H.S. (1997). *Antioxidants and Disease Prevention*. Florida: CRC Press Inc., 3-19.

Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P. ve Moser, U.K. (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, ***53***, 326S-334S.

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y. (2006). Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, ***23***, 85-89.

Gökşin, A. (1982). *Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen Üvez (Sorbus L.) Taksonlarının Yayılışları ile Önemli Bazı Morfolojik ve Anatomik Özellikleri Üzerine Araştırmalar.* Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi No. 120, Ankara.

Gracy, R.W., Talent, J.M., Kang, Y. ve Conrad, C.C. (1999). Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult? *Muttation Research*, ***428 (1-2)***, 17-22.

Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, ***41(12)***, 1819-1828.

Gültekin, H.C. (2011). Üvez (*Sorbus* L.) Türlerimiz ve Fidan Üretim Teknikleri. Çevre ve Orman Bakanlığı Ağaçlandırma ve Erozyon Kontrolü Genel Müdürlüğü Fidanlık ve Tohum İşleri Daire Başkanlığı, Tekbaş Matbaası, Ankara, ISBN 978-605-393-001-3, http://www.agm.gov.tr/AGM/Files/yayinlar/UVEZ.pdf (Erişim Tarihi: 5.5.2013.

Gültekin, H, C. ve Alan, M. (2007). Türkiye'nin üvezleri (*Sorbus* L.) *Floraplas Dergisi*, Mayıs 2007.

Gültekin, Ü.G. ve Gültekin, H.C. (2006). Alev Renkli Ağaçlar Üvez. *Bilim ve Teknik Dergisi*, ***458***, 56-57.

Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. A basis for drug selection. *Drugs*, ***42(4)***, 569-605.

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

Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews, **55(1)***, S44–S52.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology, **141***, 312–322.

Halliwell, B. ve Aruoma, O.I. (1997). Free radicals and antioxidants: The need for *in vivo* markers of oxidative stress. İçinde O.I. Aruoma ve S.L. Cuppett (Eds.), *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concepts.* AOCS Press; 1-22.

Halliwell, B. ve Cross, C.E. (1994). Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives, **10***, 5-12.

Halliwell, B. ve Grootveld, M. (1987). The measurement of free radical reactions in humans: Some thoughts for future experimentation. *Febs Letters, **213***, 9-14.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1984). Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods in Enzymology, **105***, 47-56.

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

Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press.

Hanasaki, Y., Owaga, S. ve Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine, **16***, 845-850.

Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y. ve Yasuhara, E. (1989). Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **37***, 2016-2021.

Henderson, W.R. (1994). The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of Internal Medicine, **121***, 684-697.

Hogg, N. (1998). Free radicals in disease. *Seminars in Reproductive Endocrinology, **16(4)***, 241-248.

Hollman, P.C.H. ve Katan, M.B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy, **51(8)***, 305-310.

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

Hukkanen, A.T., Pölönen, S.S., Kärenlampi, S.O. ve Kokko, H.I. (2006). Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, ***54***, 112-119.

Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. ve Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, ***34(6)***, 879-886.

Ihde, A.J. (1967). The history of free radicals and Moses Gomberg's contributions. *Pure and Applied Chemistry*, ***15(1)***, 1-14.

İbadova, S. (2006). Bazı Hypericum Türlerinin Fenolik Bileşimi ile Antioksidan ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Jialal, I. ve Fuller, C.J. (1993). Oxidized LDL and antioxidants. *Clinical Cardiology*, ***16*** (Suppl I), I6-9.

Justesen, U., Knuthsen, P. ve Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, ***A 799***, 101-110.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. ve Heinonen, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***47***, 3954-3962.

Kalak, S. (1995). Tip II Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Lökosit Zarı Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Savunma Sistemlerinin Araştırılması. Uzmanlık tezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.

Kalender, S., Kalender, Y., Ögütçü, A., Uzunhisarcıklı, M., Durak, D. ve Açıkgöz, F. (2002). Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: The protective effect of vitamin E. *Toxicology*, ***202***, 227-235.

Kaur, H. ve Perkins, M.J. (1991). The free radical chemistry of food additives, İçinde O.I, Aruoma, B. Halliwell (Eds.), *Free Radicals and Food Additives*, London: Taylor and Francis.

Kazanç, M.B. (1997). Antioksidan vitaminler. *Sendrom Temmuz*, 14-22.

Keskin, H. ve Erkmen, G. (1987). *Besin Kimyası*. Beşinci Basım, Güryay Matbaacılık İstanbul; 25-35.

Khan, A.U. ve Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry and Biology*, ***2(7)***, 437-445.

Kılınç, K. ve Kılınç, A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, ***33(2)***, 110-118.

Kılınç, A. ve Kılınç K. (2003). *Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri*, Palme Yayıncılık, Ankara.

Kim, D-O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H-Y. ve Lee, C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***51***, 6509-6515.

Klein, P.J., Van Vleet T.R., Hall J.O. ve Coulombe R.A. (2003). Effects of dietary butylated hydroxytoluene on aflatoxin B1-relevant metabolic enzymes in turkeys, *Food and Chemical Toxicology*, ***41(5)***, 671-678.

Koca, N. ve Karadeniz, F. (2005). Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda*, ***30(4)***, 229-236.

Koçak, M. (2006). Bazı *Sorbus* L. (Üvez) Türleri Tohumlarının Çimlenme ve Fidecik Gelişimi Üzerine Hormonal İşlemin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Koşar, M., Bozan, B., Temelli, F. ve Başer, K.H.C. (2002). Sumak (*Rhus Coriaria*)'ın fenolik bileşikleri ve antioksidan etkileri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (14. BİHAT), Bildiriler, 113-124, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.

Köksal, E. (2007). Karnabahar (*Brassica Oleracea* L.) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kültür, S. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, ***111***, 341-364.

Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, ***27(4)***, 969-978.

Lavelli, V., Peri, C. ve Rizzola, A. (2000). Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***48(5)***, 1442-1448.

Leclercq, C., Arcella, D. ve Turrini A. (2000), Estimates of the theoretical maximum daily intake of erythorbic acid, gallates, butylated hydroxyanisole (BHA) and

butylated hydroxytoluene (BHT) in Italy: A stepwise approach. *Food and Chemical Toxicology*, ***38(12)***, 1075-1084.

Lindsay, R.C. (1996). Food Additives. İçinde O.R. Fennema (Ed), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York; 767-823.

Lloyd, R.V., Hanna, P.M. ve Mason, R.P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*, ***22(5)***, 885-888.

Logani, M.K. ve Davies, R.E. (1980). Lipid oxidation: Biologic effects and antioxidants- A review. *Lipids*, ***15(6)***, 485-495.

Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G. ve Bellavite, P. (1999). A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Analytical Biochemistry*, ***269(1)***, 38-44.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G. ve Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: A review. *Journal of the Science Food and Agriculture*, ***86,*** 2046-2056.

Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. ve Lima, J.L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, ***613(1)***, 1-19.

Maher, P., Lewerenz, J., Lozano, C. ve Torres, J.L. (2008). A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *Journal of Neurochemistry*, ***107(3)***, 690-700.

Marklund, S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, ***79(24)***, 7634-7638.

Martínez, M.C. ve Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, ***11(3)***, 669-702.

Matthäus, B. (2002). Antioxidant acitvity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agriculturel and Food Chemistry*, ***50***, 3444-3452.

McCord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, ***312(3)***, 159-163.

McCord, J.M. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry*, ***26(5)***, 351-357.

McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. The American Journal of Medicine, ***108(8)***, 652-659.

McNeil, J.J., Robman, L., Tikellis, G., Sinclair, M.I., McCarty, C.A. ve Taylor, H.R. (2004). Vitamin E supplementation and cataract: Randomized controlled trial. *Ophthalmology, **111(1)***, 75-84.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry, **263(33),*** 17205-17208.

Meydani, M. (2001). Antioxidants and cognitive function. *Nutrition Reviews*, ***59(8)***, S75-S82.

Meyer, O. ve Hansen, E. (1980). Behavioural and developmental effects of butylated hydroxytoluene dosed to rats in utero and in the lactation period. *Toxicology*, ***16(3)***, 247-258.

Miller, D.D. (1996). Minerals. İçinde O.R. Fennema (Ed), *Chemistry*, Marcel Dekker, New York; 617-649.

Natanson, C., Hoffman, W.D., Suffredini, A.F., Eichacker, P.Q. ve Danner, R.L. (1994). Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Annals of Internal Medicine, **120(9)***, 771-783.

Nawar, W.W. (1996). Lipids. İçinde O.R. Fennema (Ed), *Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York; 225-319.

Ndhlala, A.R., Moyo, M. ve Staden, J.V. (2010). Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules, **15(10)***, 6905-6930.

Nicolescu, V-N., Hochbichler, E., Coello, J., Ravagni, S. ve Giolietti, V. (2009). Ecology and silviculture of wild service tree (Sorbus torminalis (L.) Crantz): A literature review. *Die Bodenkultur-Journal for Land Management, Food and Environment.* http://www.valbro.uni-freiburg.de/pdf/poster_nicolescu.pdf (Erişim Tarihi: 15.03.2013).

Niki, E. (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, ***44***, 227-253.

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

Olszewska, M.A. (2011a). Variation in the phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Sorbus aucuparia* leaf extracts during vegetation. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research, **68***, 937-944.

Olszewska, M.A. (2011b). *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research, **68***, 945-953.

Olszewska, M.A. ve Michel, P. (2009). Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Natural Product Research, **23***, 1507-1521.

Olszewska, M.A., Nowak, S., Michel, P., Banaszczak, P. ve Kicel, A. (2010). Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus *Sorbus sensu strict*. *Molecules, **15***, 8769-8783.

Olszewska, M.A., Presler, A. ve Michel, P. (2012). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected *sorbus* species. *Molecules, **17***, 3093-3113.

Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O., Can, A. ve Yanardag, R. (2009). *In vitro* antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry, **116***, 867-872.

Ölschläger, C., Milde, J., Schempp, H. ve Treutter, D. (2004). Polyphenols and antioxidant capacity of *Sorbus domestica* L. fruits. *Angewandte Botanik* (*Journal Applied Botany*), ***78***, 112-116.

Özdemir, G. (1993). Reaktif oksijen partikülleri. *Roche Bilimsel Eserler Serisi*. Eskişehir.

Öztürk, N., Tunalıer, Z., Koşar, M. ve Başer, K.H. (2002). *Petroselinum crispum, Anethum graveolens* ve *Eruca sativa*'nın antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (14. BİHAT), 29-31 Mayıs 2002, Bildiriler, Eskişehir.

Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition, **53***, 1050-1055.

Parke, D.V. ve Lewis, D.F. (1992). Safety aspects of food preservatives. *Food Additives and Contaminants, **9(5)***, 561-577.

Pehluvan, M. ve Güleryüz, M. (2004). Ahududu ve bögürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe,* ***33(1-2)***, 51-57.

Peskin, A.V. (1997). Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry,* ***62(12)***, 1341-1347.

Placer, Z.A., Cushman, L.L. ve Johnson, B.C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analitical Biochemistry*, ***16(2)***, 359-364.

Podda, M. ve Grundmann-Kollmann, M. (2001). Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*, ***26***, 578-582.

Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, ***40(1)***, 1-11.

Porter, N.A. (1985). Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. İçinde T. Richardson, J.W. Finley (Eds), *Chemical Changes in Food During Processing*, Van Nostrand Rainhold Company, New York; 73-105.

Prior, R.L., Wu, X. ve Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, ***53***, 4290-4302.

Proteggente, A.R., Rehman, A., Halliwell, B. ve Rice-Evans, C.A. (2000). Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? *Biochemical and Biophysical Research Communications,* ***277(3)***, 535-540.

Rayner, B.S., Hua, S., Sabaretnam, T. ve Witting, P.K. (2009). Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *The Biochemical Journal,* ***423(2)***, 169-177.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine,* ***26(9-10)***, 1231-1237.

Reaven, P.D., Khouw, A., Beltz, W.F., Parthasarathy, S. ve Witztum, J.L. (1993). Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arteriosclerosis and Thrombosis,* ***13(4)***, 590-600.

Reiter, R.J. (1996). Antioxidant actions of melatonin. *Advances in Pharmacology*, ***38***, 103-117.

Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G. ve Acuna-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research,* ***18(1)***, 1-11.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. ve Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, ***22***, 375-383.

Safer, A. M. ve al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive, buthylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electron microscopical study. *Histolology and Histopathology*, ***14(2)***, 391-406.

Saldamlı, İ. (2007). *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara; 463-492.

Schoepfle, C.S. ve Bachmann, W.E. (1948). Moses Gomberg 1866-1947. *Journal of American Chemical Society*, ***69***, 2915-2921.

Schoneich, C. (1999). Reactive oxygen species and biological aging: A mechanistic approach. *Experimental Gerontology*, ***34***, 19-34.

Schwarz, K.B. (1996). Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radical Biology and Medicine*, ***21(5)***, 641-649.

Serteser, A., Kargıoğlu, M., Gök, V., Bağcı, Y., Musa Özcan, M. ve Arslan, D. (2009). Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *Grasas Y Aceites*, ***60***, 147-154.

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

Seymour, T.A., Li, S.J. ve Morrissey, M.T. (1996). Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste. *Journal of American Chemical Society*, ***44***, 682-685.

Shahidi, F. ve Naczk, M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing Company, Lanchester, USA; 199-225.

Sherwin, E.R. (1990). Antioxidants, İçinde A.L., Branen, P. M. Davidson, S. Salminen (Eds.), *Food Additives,* Marcel Dekker Inc., New York.

Shetty, K. ve Labbe, RG. (1998). Food borne pathogens, health and dietary phytochemicals. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition,* ***7(3/4)***, 270-276.

Simán, C.M. ve Eriksson, U.J. (1996). Effect of butylated hydroxytoluene on α-tocopherol content in liver and adipose tissue of rates. *Toxicology Letters*, ***87***, 103-108.

Sinha, S., Singh, S.N. ve Ray, U.S. (2009). Total antioxidant status at high altitude in lowlanders and native highlanders: Role of uric acid. *High Altitute Medicine and Biology*, ***10***, 269-274.

Slater, T.F. (1987). Free radicals and tissue injury: Fact and fiction. *British Journal of Cancer, Suppl* ***8***, 5-10.

Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, ***28***, 49-55.

Soriani, M., Pietraforte, D. ve Minetti, M. (1994). Antioxidant potential of anaerobic human plasma: Role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archieves of Biochemistry and Biophysics,* ***312***, 180-188.

Sözmen, Y.E. (1997). Biyolojik oksidasyon, radikal kavramı ve oksijen radikalleri. Onat T, Emerk K (Ed.), *Temel Biyokimya.* 2. Baskı. Saray Medikal Yayıncılık. İzmir; 520-526.

Stevenson, M.A., Pollock, S.S., Coleman, C.N. ve Calderwood, S.K. (1994). X-irradiation, phorbol esters, and H_2O_2 stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Research,* ***54(1)***, 12-15.

Stohs, S.J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic and Clinical Physical Pharmacy*, ***6(3-4)***, 205-228.

Stratton, S.P. ve Liebler, D.C. (1997). Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of β-carotene and α-tocopherol. *Biochemistry*, ***36(42)***, 12911-12920.

Stryer, L. (1995). *Biochemistry*, 4th Ed., W.H. Freeman and Company, New York.

Sumien, N., Heinrich, K.R., Shetty, R.A., Sohal, R.S. ve Forster, M.J. (2009). Prolonged intake of coenzyme Q_{10} impairs cognitive functions in mice. *The Journal of Nutrition,* ***139***, 1926-1932.

Sunucu Karafakıoğlu, Y. (2010). Antioksidanlar ve bir antioksidan olarak taurin. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, ***3(1)***, 55- 61.

Şen, M. (2011). Üvez Meyvalarının Antioksidan Aktivitesi, Yüksek isans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Takami, M., Preston, S.L., Toyloy, V.A. ve Behrman, H.R. (1999). Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis, *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, ***276(4)***, E 684-E688.

Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B. ve Atik, U. (2000). Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, ***1***, 52-58.

Termentzi, A., Kefalas, P. ve Kokkalou, E. (2006). Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, ***98***, 599-608.

Termentzi, A., Zervou, M. ve Kokkalou, E. (2008). Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from Sorbus domestica fruits. *Food Chemistry*, ***116***, 371-381.

Tsitsa-Tzardi, E., Loukis, A. ve Philianos, S. (1992). Constituents of *Sorbus torminalis* Leaves. *Fitoterapia*, ***63***, 189-190.

Tuner, H. (2007). Bazı Doğal ve Sentetik Antioksidanların Radyasyon Duyarlılıklarının Elektron Spin Rezonans (ESR) Spektroskopisi ile İncelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Uysal, M. (2010). Serbest radikaller ve oksidatif stres. İçinde F. Gürdol, E. Ademoğlu (Eds.), *Biyokimya Gözden Geçirilmiş 2. Baskı*. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul; 647-652.

Van Der Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J. ve Faulkner, J.A. (1997). Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. *Journal of Applied Physiology*, ***83(3)***, 817-823.

Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E. ve Vasiliadou, S. (1997). Effectiveness of natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, ***205***, 93-96.

Wichi, H. P. (1988). Enhanced tumuor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, ***26***, 717-723.

Wright, A., Bubb, W.A., Hawkins, C.L. ve Davies, M.J. (2002). Singlet oxygen-mediated protein oxidation: Evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochemistry and Photobiology*, ***76***, 35-46.

Xiu, R.J., Freyschuss, A., Ying, X., Berglund, L., Henriksson, P. ve Björkhem, I. (1994). The antioxidant butylated hydroxytoluene prevents early cholesterol induced microcirculatory changes in rabbits. *Journal of Clinical Investigation*, ***93(6)***, 2732-2737.

Yağcı, C., Toker, M.C. ve Toker, G. (2008). Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoitler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* ***1 (1)***, 47-58.

Yen, G.C. ve Wu, J.Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, ***65***, 375-379.

Yılmaz, C. (2010). Tokat Yöresinde Yetişen Bazı Üvez (*Sorbus domestica* L.) Tiplerinin Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Farklı Uygulamaların Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gözde	**Soyadı**	Hasbal
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	26.10.1987
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	24163866938
Email	gzdehasbal@hotmail.com	**Tel**	0546 468 15 93

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Beykoz Fevzi Çakmak Lisesi (Y.D.A.)	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	Orta	İyi	55	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	78,68027	79,23698	69,69427

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri:

Sertifikalar:

İncekaralar, Thermo Scientific 'Laminar Flow &CO_2 İnkübatör Semineri (2012).
İncekaralar 'Eppendorf Pipet Semineri' (2012).
II. Merck Millipore Akademisi Semineri (2012).
medApex Medikal SQA-V Tam Otomatik Sperm Analiz Cihazı Eğitimi (2011).
Psikologlar ve Psikiyatristler Derneği Temel Psikoloji Sertifikası (2011).
İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi (2007).
İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi cDNA Sentezi Çalıştayı (2007).

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, fotoğraf çekmek, koleksiyon yapmak, konsere gitmek.