**T.C.**

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BAZI SENTETİK ANTİOKSİDANLARIN**

**2, 2-DİFENİL-1-PİKRİLHİDRAZİL (DPPH) RADİKAL SÜPÜRME KAPASİTESİ YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ÖZGE BARDAKÇI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VFT-15084 proje numarası ile desteklenmiştir

**AYDIN–2017**

# KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Özge BARDAKÇI tarafından hazırlanan “**Bazı sentetik antioksidanların 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin araştırılması**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

 Tez Savunma Tarihi: 28/07/2017

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Üye  | : Prof. Dr. Cavit KUM  | Adnan Menderes Üniversitesi  | ....………….. |
| Üye  | : Doç. Dr. Fatma KOCASARI  | Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi | ....………….. |
| Üye (T.D)  | : Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU  | Adnan Menderes Üniversitesi  | ....………….. |

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ……………..……..… tarih ve ………………………… sayılı oturumunda alınan …………………… nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

 Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

 Enstitü Müdürü

# TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU’na çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda destek olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Cavit KUM’a, Prof. Dr. Ferda AKAR’a, Doç. Dr. Selim SEKKİN’e ve Yrd. Doç. Dr. Ümit KARADEMİR’e, tez çalışmanın deneysel aşamasında hep yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Hande Sultan ŞAHİNER’e teşekkürü bir borç bilirim.

Beni bugünlere getiren aileme, tez çalışmam süresince gösterdikleri sabır, özveri ve destekleri için ayrıca teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

[KABUL VE ONAY SAYFASI i](#_Toc489351798)

[TEŞEKKÜR ii](#_Toc489351799)

[İÇİNDEKİLER iii](#_Toc489351800)

[SİMGELER ve KISALTMALAR vi](#_Toc489351801)

[ŞEKİLLER DİZİNİ vii](#_Toc489351802)

[TABLOLAR DİZİNİ viii](#_Toc489351803)

[ÖZET ix](#_Toc489351804)

[ABSTRACT x](#_Toc489351805)

[1. GİRİŞ 1](#_Toc489351806)

[2. GENEL BİLGİLER 3](#_Toc489351807)

[2.1. Serbest Radikaller 3](#_Toc489351808)

[2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) 4](#_Toc489351809)

[2.1.1.1. Süperoksit (O2∙-) radikali 5](#_Toc489351810)

[2.1.1.2. Hidrojen peroksit (H2O2) 5](#_Toc489351811)

[2.1.1.3. Hidroksil (OH∙) radikali 6](#_Toc489351812)

[2.1.1.4. Hipokloröz asit (HOCl) 7](#_Toc489351813)

[2.1.1.5. Singlet oksijen (1O2) 7](#_Toc489351814)

[2.1.2. Reaktif Azot Türleri (RNS) 8](#_Toc489351815)

[2.1.2.1. Nitrik oksit (NO) 8](#_Toc489351816)

[2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları 8](#_Toc489351817)

[2.2.1. Endojen Kaynaklar 8](#_Toc489351818)

[2.2.1.1. Mitokondriyal elektron transportu 9](#_Toc489351819)

[2.2.1.2. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda elektron transport sistemleri 9](#_Toc489351820)

[2.2.1.3. Peroksizomlar 9](#_Toc489351821)

[2.2.1.4. Plazma membranları 10](#_Toc489351822)

[2.2.1.5. Otooksidasyon 10](#_Toc489351823)

[2.2.1.6. Enzimler ve proteinler 10](#_Toc489351824)

[2.2.1.7. Araşidonik asit metabolizması 11](#_Toc489351825)

[2.2.1.8. Geçiş metalleri 11](#_Toc489351826)

[2.2.1.9. Fagositoz ve solunumsal patlama 11](#_Toc489351827)

[2.2.2. Ekzojen Kaynaklar 13](#_Toc489351828)

[2.3. Serbest Radikallerin Etkileri 13](#_Toc489351829)

[2.3.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri 14](#_Toc489351830)

[2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri 15](#_Toc489351831)

[2.3.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA’ya Etkileri 15](#_Toc489351832)

[2.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri 15](#_Toc489351833)

[2.4. Antioksidanlar 16](#_Toc489351834)

[2.4.1. Doğal Antioksidanlar 17](#_Toc489351835)

[2.4.1.1. Enzimatik antioksidanlar 17](#_Toc489351836)

[2.4.1.1.1. *Süperoksit dismutaz* 18](#_Toc489351837)

[2.4.1.1.2. *Katalaz* 18](#_Toc489351838)

[2.4.1.1.3. *Glutatyon peroksidaz* 18](#_Toc489351839)

[2.4.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar 18](#_Toc489351840)

[2.4.1.2.1. Askorbik asit (Vitamin C) 19](#_Toc489351841)

[2.4.1.2.2. α-Tokoferol (Vitamin E) 19](#_Toc489351842)

[2.4.1.2.3. Karotenoidler 19](#_Toc489351843)

[2.4.2. Sentetik Antioksidanlar 20](#_Toc489351844)

[2.5. Oksidatif Stres 20](#_Toc489351845)

[2.6. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri 21](#_Toc489351846)

[2.6.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi 22](#_Toc489351847)

[2.7. Radikal Süpürme Kapasitesi Araştırılan Antioksidanlar 24](#_Toc489351848)

[2.7.1. Vitamin C 24](#_Toc489351849)

[2.7.2. Vitamin E 24](#_Toc489351850)

[2.7.3. Kuarsetin 25](#_Toc489351851)

[2.7.4. Ellagik asit 25](#_Toc489351852)

[2.7.5. Resveratrol 25](#_Toc489351853)

[2.7.6. Kurkumin 26](#_Toc489351854)

[2.7.7. Silimarin 26](#_Toc489351855)

[3. GEREÇ ve YÖNTEM 27](#_Toc489351856)

[3.1. Gereç 27](#_Toc489351857)

[3.1.1. Kimyasallar 27](#_Toc489351858)

[3.1.2. Cihazlar, Araç ve Gereçler 27](#_Toc489351859)

[3.2. Yöntem 27](#_Toc489351860)

[4. BULGULAR 29](#_Toc489351861)

[5. TARTIŞMA 35](#_Toc489351862)

[6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 38](#_Toc489351863)

[KAYNAKLAR 39](#_Toc489351864)

[ÖZGEÇMİŞ 47](#_Toc489351865)

# SİMGELER ve KISALTMALAR

|  |  |
| --- | --- |
| **DPPH** | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| **CO2** | : Karbondioksit  |
| **ATP** | : Adenozin trifosfat |
| **O2** | : Oksijen |
| **H2O** | : Su |
| **GSH** | : Glutatyon  |
| **GS∙** | : Tiyil radikali  |
| **ROS** | : Reaktif oksijen türleri  |
| **O2∙-** | : Süperoksit radikali |
| **H2O2** | : Hidrojen peroksit |
| **OH∙** | : Hidroksil radikali |
| **HOCl** | : Hipokloröz asit |
| **1O2** | : Singlet oksijen |
| **RNS** | : Reaktif azot türleri  |
| **NO** | : Nitrik oksit |
| **SOD** | : Süperoksit dismutaz |
| **ROO·** | : Peroksil radikalleri |
| **CAT** | : Katalaz |
| **NAD** | : Nikotinamid adenin dinükleotit |
| **sAMP** | : Siklik adenozin monofosfat |
| **MDA** | : Malondialdehit |
| **GSH-Px** | : Glutatyon peroksidaz |
| **BHA** | : Bütillenmiş hidroksianisol |
| **BHT** | : Bütillenmiş hidroksitoluen |
| **HAT** | : Hidrojen atom transferi |
| **ET** | : Elektron transferi |
| **EC50** | : Etkin konsantrasyon 50 (Efficient concentration 50) |
| **GSSG** | : Oksitlenmiş glutatyon |
| **LOOH** | : Lipid peroksitleri |
| **NADPH** | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

[Şekil 1. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri 12](#_Toc489291820)

[Şekil 2. Serbest radikallerin hücresel hedefleri 14](#_Toc489291821)

[Şekil 3. Antioksidanların hücredeki etkileri 17](#_Toc489291822)

[Şekil 4. Oksidatif stresin şematik gösterimi 20](#_Toc489291823)

[Şekil 5. DPPH radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon 23](#_Toc489291824)

[Şekil 6. Farklı konsantrasyonlardaki vitamin C’nin % inhibisyon değerleri. 29](#_Toc489291825)

[Şekil 7. Farklı konsantrasyonlardaki troloxun % inhibisyon değerleri. 30](#_Toc489291826)

[Şekil 8. Farklı konsantrasyonlardaki ellagik asitin % inhibisyon değerleri. 30](#_Toc489291827)

[Şekil 9. Farklı konsantrasyonlardaki kuarsetinin % inhibisyon değerleri. 31](#_Toc489291828)

[Şekil 10. Farklı konsantrasyonlardaki kurkuminin % inhibisyon değerleri. 31](#_Toc489291829)

[Şekil 11. Farklı konsantrasyonlardaki resveratrolün % inhibisyon değerleri. 32](#_Toc489291830)

[Şekil 12. Farklı konsantrasyonlardaki silimarinin % inhibisyon değerleri. 32](#_Toc489291831)

[Şekil 13. Farklı konsantrasyonlardaki vitamin E’nin % inhibisyon değerleri. 33](#_Toc489291832)

# TABLOLAR DİZİNİ

[**Tablo 1.** DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılan incelenen antioksidan bileşiklerin EC50 değerleri. 33](#_Toc489291728)

#  ÖZET

**BAZI SENTETİK ANTİOKSİDANLARIN 2, 2-DİFENİL-1-PİKRİLHİDRAZİL (DPPH) RADİKAL SÜPÜRME KAPASİTESİ YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Bardakçı Ö. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Programı Yüksek Lisans** **Tezi, Aydın, 2017.**

Serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidan günümüzde yaygın olarak tartışılan konular haline gelmiştir. Canlı fizyolojisinde oksidatif stresin meydana getirdiği hasar sebebiyle son yıllarda antioksidanlara olan ilgi oldukça artmıştır. Antioksidanların veya tüketilen besin maddelerinin ne kadar antioksidan etkili olduğunu belirlemek ve karşılaştırmak için çeşitli tayin yöntemleri mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitelerini 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan kapasite tayin yöntemi ile belirlemek ve karşılaştırmaktır.

Bu amaçla 0-400 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan vitamin C, trolox, kuarsetin, ellagik asit, kurkumin, vitamin E, resveratrol ve silimarinin radikal süpürme aktiviteleri DPPH kapasite tayin yöntemi ile belirlendi. Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan DPPH radikalini süpürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri ile çizilen grafiklerden EC50 değerleri hesaplandı.

Çalışmada standart olarak kullanılan vitamin C ve troloxun EC50 değerleri sırası ile 1,697 µg/ml ve 1,729 µg/ml olarak belirlendi. Standart ile karşılaştırıldığında en düşük antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın silimarin (EC50=7,812 µg/ml) ve en yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın ise kuarsetin (EC50=1,722 µg/ml) olduğu belirlendi.

Elde edilen sonuçlar ışığında hayvan deneyi çalışmalarında tercih edilen ve sık kullanılan sentetik antioksidanların seçiminde antioksidan kapasitelerinin de göz önünde bulundurulması ve araştırılması yapılan maddeye göre antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin seçilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), antioksidan aktivite, bazı sentetik antioksidanlar.

# ABSTRACT

**INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY BY**

**2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) RADICAL SWEEPING CAPACITY METHOD OF SOME SYNTHETIC ANTIOXIDANT**

**Bardakçı Ö. Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Pharmacology and Toxicology (Veterinary) M.Sc. Program, Aydın, 2017.**

Nowadays free radicals, oxidative stress and antioxidant have become one of the widely discussed common topics. Due to damage caused by oxidative stress in the live physiology, the interest in antioxidants has increased considerably in recent years. There are various of methods of identification to determine and compare the antioxidant effectiveness of antioxidants or consumed nutrients. The aim of this study is to identify and compare the antioxidant activities of some synthetic antioxidants with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioxidant capacity determination method.

For this purpose, vitamin C, trolox, quercetin, ellagic acid, curcumin, vitamin E, resveratrol and silymarin were prepared at different concentrations (0-400 μg / ml). Determination of radical sweeping activities used the DPPH capacity determination method.

EC50 values were calculated from the graphs plotted with % inhibition values of DPPH radical scavenging activities against different concentrations of antioxidant.

In the study vitamin C and trolox EC50 values used as standard were determined 1,697 μg / ml and 1,729 μg / ml, respectively. When compared to standards, the lowest antioxidant scavenging activity was found to be silymarin (EC50 = 7,812 μg / ml) and the highest antioxidant scavenging activity was determined quarsetin (EC50 = 1,722 μg / ml).

In the light of these results obtained, antioxidant capacities should be taken into consideration in the selection of commonly used synthetic antioxidants in animal studies. The antioxidant capacity determination methods should be chosen according to the substance to be investigated.

**Key words:** 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), antioxidant activity, some synthetic antioxidants.

# 1. GİRİŞ

Serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidan yaygın olarak tartışılan konulardır. Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunduran ve oldukça reaktif olan atom ya da moleküllere serbest radikal adı verilmektedir. Serbest radikaller, yaşamsal faaliyetler sırasında organizmanın metabolizması veya solunum ve enzim reaksiyonları (*ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz*) gibi endojen kaynaklar ile hava kirliliği, ultraviyole ışınlar, sigara dumanı, ilaçlar (miktoksinler, pestisidler) gibi ekzojen kaynaklarla da meydana gelmektedirler (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller; lipidler, membranlar, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücre yapılarına zarar verirler (Valko ve ark, 2006). Radikallerin saldırısı sonucunda hücre meydana gelen tahribat oksidatif hasar olarak tanımlanır (Ardağ, 2008).

Oksidatif stres bütün canlılarda meydana gelebilmektedir. Oksidatif stresin insanlardaki nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer ve Parkinson, hipertansiyon, dislipidemi, arteroskleroz, miyokardiyal enfeksiyon, obezite, ürolithiasis, astım, pulmuner fibrosis, katarakt, sistemik lupus eritromatozu ve talaseminin patogenezinde ve gelişiminde önemli bir rol oynadığını bilinmektedir (Rahman ve ark, 2012).

Serbest radikallerin giderilmesi için organizmada enzimatik ve enzimatik olmayan koruma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmaların en önemlilerini *süperoksit dismutaz* (SOD), *glutatyon* (GSH), *glutatyon* *peroksidazlar* (GSH-Px), *glutatyon redüktaz* (GSSG-R), *katalaz* (CAT) ve antioksidan besinler oluşturmaktadır. Bir başka deyişle oksidatif hasar, bu mekanizmalara karşı vücutta oluşan serbest radikallerin ağır basması sonucu oluşur (Fang ve ark, 2002).

Canlı fizyolojisinde oksidatif stresin meydana getirdiği hasar sebebiyle son yıllarda antioksidanlara olan ilgi oldukça artmıştır. Antioksidanların veya tüketilen besin maddelerinin ne kadar antioksidan etkili olduğunu belirlemek ve karşılaştırmak için çeşitli tayin yöntemleri mevcuttur (Prior ve ark, 2005). Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan kapasite tayin yöntemidir.

Antioksidan etki aktivitesinin araştırıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan antioksidanlar üretici firmalar tarafından genellikle sentetik hazırlanan maddelerdir. Dolaysıyla doğal yollarla elde edilen antioksidanların bu tip çalışmalarda kullanımı seyrektir. Bu çalışmanın amacı bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitelerini belirlemek ve karşılaştırmaktır. Elde edilecek sonuçlar ile hayvan deneyi çalışmalarında tercih edilen ve sık kullanılan bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitelerine ışık tutması ve deneysel çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Serbest Radikaller

Canlının yaşamını sürdürdüğü çevrede bulunan çeşitli fiziksel etkenler ile fizyolojik ya da patolojik reaksiyonlar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı söz konusudur (Delibaş ve Özcankaya, 1995; Kılınç ve Kılınç, 2002). Hücresel boyutta da yüksek miktar ve çeşitlilikte radikaller üretilmekte olup eşleşmemiş elektronunun kazandırdığı bu reaktiflik lipid, protein, DNA ve nükleotid gibi biyolojik materyalede zarar verebilmektedir (Diplock, 1998; Gilbert, 2000).

Proton ve nötronların oluşturduğu çekirdek ile bu pozitif yüklü çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüke sahip elektronlardan atomlar oluşur (Kılınç ve Kılınç, 2002). Elektronlar çift olarak orbital adı verilen bölgede bulunurlar (Tamer ve ark, 2000). Dış orbitallerinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllere serbest radikaller denilmektedir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron bulundurdukları için oldukça reaktif maddelerdir. Eşleşmemiş elektronlar üst kısma yazılan tek nokta ile gösterilmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993).

Memeliler bitkilerin güneş enerjisinden dönüştürdüğü redükte molekülleri birçok biyokimyasal tepkime sonucunda karbondioksit (CO2)ve suya (H2O) indirgemektedirler. Böylece açığa çıkan enerjiyi kullanılabilir ve depo edilebilir yüksek enerjili adenozin trifosfat (ATP) gibi fosfat bileşiklerine dönüştürmektedir. Redoks reaksiyonları olarak adlandırılan bu indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları moleküler oksijene (O2) okside edilebilir moleküllerden elektron transferini içermektedirler. Bir maddenin elektron kaybetmesine oksidasyon (yükseltgenme), elektron almasına ise redüksiyon (indirgenme) denilmektedir. Redoks reaksiyonları elektron transferinin yanı sıra kovalent bağlardaki elektron yörüngelerindeki değişmeler ile de olmaktadır. Okside olan ajanlar oldukça elektrofiliktirler. Böylece başka moleküllerden elektron alarak serbest radikalleri oluşturmaktadırlar (Cheeseman ve Slater, 1993).

Serbest radikaller nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın 3 yolla meydana gelmektedirler (Akkuş, 1995; Kılınç ve Kılınç, 2002).

1. Kovalent bağlarda homolotik kırılma: Yüksek sıcaklık (500-600 °C) ve yüksek elektromanyetik dalgalar kimyasal bağları kırmaktadırlar. Bu kırılma esnasında bağ yapısında bulunan iki elektronun ayrı ayrı atomlarda kalmasına homolotik kırılma denilmektedir. Atomlar üzerinde kalan elektronlar eşleşmemiş elektronlardır. Homolotik kırılan organik moleküllerde bulunan bağlar zıt yüklü reaktif iyon çiftleri oluşturmaktadırlar.

2. Normal bir elektronun elektron kaybetmesi: Serbest radikal özelliğinde olmayan bir molekül elektron kaybederek dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalması ve radikal formunun oluşmasıdır. Örneğin GSH radikalleri indirgemesi sırasında tiyil radikali (GS∙) oluşmaktadır. Tepkimeye giren iki tiyil radikali sonucunda meydana gelen tür ise glutatyonun oksitlenmiş formudur (GSSG).

3. Normal bir moleküle elektron transferi: Serbest radikal özelliğinde olmayan bir moleküle elektron eklenmesi sonucu oluşan bu yol biyolojik sistemlerde yaygın olarak meydana geldiği için oldukça önem arz etmektedir.

Sonuçta üretilen serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabildiği gibi organik ya da inorganik moleküller olabilmektedirler. Demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), kobalt (Co), mangan (Mn), nikel (Ni), krom (Cr) ve molibden (Mo) gibi elementlerde eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmemektedirler. Bu elementler canlıların oksijen kullanabilmesi için gerekli olduğundan geçiş elementi ya da geçiş metalleri olarak adlandırılmaktadırlar (Diplock, 1998).

### 2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Canlılarda bulunan en önemli serbest radilkaller oksijen tarafından oluşturulmaktadır. Oksijen; karbon (C), hidrojen (H), nitrojen (N) ve kükürt (S) ile birlikte, organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturduğu ve aerobik canlılarda da enerji metabolizmasına katıldığı için bütün canlılar için vazgeçilmez bir elementtir (Diplock, 1998). Oksijen eşleşmemiş iki elektron barındırdığı için diradikal olarak adlandırılır ve bu sayede başka serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedir. Oksijen farklı faktörlerin etkisiyle ya da yüksek konsantrasyonda bulunduğu yerlerde toksik olan reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilen serbest radikal kaynaklarını (süperoksit (O2∙-) radikali, hidrojen peroksit (H2O2), hidroksil (OH∙) radikali, hipokloröz asit (HOCl), singlet oksijen (1O2)) oluşturabilmekte ve bu organizma için tehlikeli olabilmektedir (Mandal ve ark, 2009). Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif azot türleri de bulunmaktadır.

#### 2.1.1.1. Süperoksit (O2∙-) radikali

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde doğal olarak bulunan moleküler O2’nin çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron transferi ile indirgenmesi sonucu oluşan O2∙- radikali aşağıda gösterilmiştir (Çaylak, 2011).

O2 +e- → O2 **∙ -**

Süperoksit, serbest radikal olmasına rağmen tek başına fazla bir zarar vermemektedir. Asıl önemi H2O2’in kaynağı olması, geçiş metal iyonlarının dönüşümlü redoks reaksiyonlarındaki işlevi ve serbest radikal reaksiyonlarındaki kullanımıdır (Yapar, 2006).

Aşağıda verilen tepkime indirgen geçiş metallerinin (Fe, Cu gibi) otooksidasyonu sonucu oluşan O2 ∙ -radikallerini göstermektedir.

O2 + Fe+2 Fe+3 + O2 **∙ -**

O2 + Cu+ Cu+2 + O2 **∙ -**

#### 2.1.1.2. Hidrojen peroksit (H2O2)

Süperoksite bir elektron transferi ya da O2’e çevresindeki moleküllerden iki elektron eklenmesi ile aşağıda gösterilen tepkimede olduğu gibi H2O2 oluşmaktadır. *D-amino asit oksidaz* ve *glikolat oksidaz* ile direkt olarak meydana geldiği de bilinmektedir (Maddipati ve Marnett, 1987).

O2 **∙ -**+ e- + 2H+ → H2O2

O2 + 2e- + 2H+ → H2O2

Hidrojen peroksitin biyolojik sistemlerdeki önemli üretimi aşağıda gösterildiği gibi SOD ile olmaktadır.

2O2 **∙ -**+ 2H+ SOD O2 + H2O2

Bu reaksiyon sonrasında radikal olmayan ürünler oluşmaktadır. Hidrojen peroksit serbest radikal olarak tanımlanmamasına rağmen oldukça reaktif olan OH**∙** radikalinin oluşumunda bulunmasından dolayı önemli bir oksidandır (Delibaş ve Özcankaya, 1995).

#### 2.1.1.3. Hidroksil (OH∙) radikali

Hidroksil radikali ROS’leri arasında tüm biyolojik makromoleküllerle (lipitler, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar) reaksiyona girebilecek en güçlü ve en zararlı radikaldir (Lloyd ve ark, 1997). Canlılarda OH**∙** radikali iki mekanizma ile meydana gelmektedir. Bunlar Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıdır.

Fenton reaksiyonu, aşağıda yer alan tepkimelerde de gösterildiği gibi H2O2’inFe+2 ve diğer geçiş metalleri (Mn, Zn, Mo gibi) tarafından indirgenerek OH**∙** radikali oluşturmasıdır (Nappi ve Vass, 1998).

Fe+3 + O**∙-** → O2 + Fe+2

Fe+2 + H2O2 → Fe+3 + OH**·** + OH**-**

Net sonuç: O**∙-** + H2O2 → OH**·**+ OH**-**+ O2

Haber-Weiss reaksiyonu ise tepkimede görüldüğü üzere O**∙-**’in H2O2 ile reaksiyona girerek OH**∙** radikalini oluşturmasıdır.

O**∙-**+ H2O2 + H+ → O + H2O + OH**·**

Aşağıdaki tepkime suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyonu ile maruziyeti sonucunda da OH· radikalioluşumunu göstermektedir.

H2O X veya Gama Işını H**·**+ OH**·**

Ayrıca aşağıdaki tepkimede hidrojen peroksitin UV ışığına maruz kalması sonucunda OH· radikali oluşabileceğini göstermektedir.

H2O2  UV 2OH**·**

#### 2.1.1.4. Hipokloröz asit (HOCl)

Güçlü bir oksidan olan HOCl radikal olmadığı halde dokularda hasara yol açmasından dolayı ROS arasında yer almaktadır. HOCl bağışıklık sistemine ait fagositik olan nötrofil ve makrofajlar tarafından enzimatik olarak bakterileri öldürmek amacıyla üretilmektedir (Murray ve ark, 1996).

HOCl aşağıda görüldüğü gibi H2O2 ve Cl iyonunun *miyeloperoksidaz* enzimi tarafından oksidasyonu ile oluşmaktadır (Murray ve ark, 1996).

H2O2 + Cl *miyeloperoksidaz*HOCl + OH**-**

OH**·** radikalinin bir kaynağını oluşturan HOCl’den Fe’e bağımlı olan ve bağımlı olmayan çeşitli reaksiyonlar aşağıdaki tepkimelerde gösterilmiştir ( Antwerpen ve ark, 2005).

HOCl + Fe+2 → OH**·** +Cl**-** + Fe+3

HOCl + O2 **∙ -** → OH**·** +Cl**-** + O2

#### 2.1.1.5. Singlet oksijen (1O2)

Oldukça reaktif olan 1O2 eşleşmemiş elektronu olmamasından dolayı radikal olmayan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olduğu gibi serbest radikal reaksiyonlarının bir ürünü olarak da oluşabilmektedir. O2’in elektronlarından birinin enerji alması ile kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi sonucu meydana gelir. Delta (δ) ve sigma (σ) olmak üzere iki şekli mevcuttur. Delta formu, sigma formuna göre daha uzun ömürlüdür (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Yukarıda bahsedilen oksijen merkezli serbest radikaller dışında ayrıca reaktif oksijen türlerinin etkisi sonucunda karbon merkezli radikaller (R**·**), peroksil radikalleri (ROO**·**), karbon merkezli alkoksil radikalleri (RO**·**), kükürt merkezli thiyl radikalleri (RS**·**), demir merkezli perferri radikali (Fe+3-O2Fe+2•) gibi önemli serbest radikaller de oluşmaktadır. Özellikle ROO**·**’nin yarı ömrü uzun olup poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelmektedir. Ayrıca GS**·**’nin O2 ile tekrar reaksiyona girmesiyle sülfenil (RSO**·**) ya da thiyl peroksil (RSO2**·**) gibi radikaller de meydana gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

### 2.1.2. Reaktif Azot Türleri (RNS)

Biyolojik sistemlerdeki en önemli reaktif azot türü nitrik oksit (NO)’tir.

#### 2.1.2.1. Nitrik oksit (NO)

 Bir N ile bir O2’in eşleşmemiş elektronlarının birleşmesi ile meydana geldiği için radikal tanımına uymaktadır. Damar endotel hücrelerinde *nitrik oksit sentetaz* enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenen NO’in yarı ömrü 20-30 saniyedir. Nitrit oksitin yarı ömrünün kısa olması nedeniyle üretimi hakkında fikir sahibi olabilmek için metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp oluşturduğu azot dioksit (NO2) ölçümleri yapılmaktadır. Nitrit oksit damar gevşemesini sağlamaktadır. Bunu ise düz kaslarda siklik guanozin monofosfat (sGMP) sentezini uyararak yapmaktadır. Vücutta meydana gelen ROS ile reaksiyona girmesi sonucunda güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) anyonunu oluşturur. Peroksinitritin ileri reaksiyonları sonucu OH**·** radikalini meydana getirdiği aşağıdaki tepkimelerde gösterilmiştir (Pacher ve ark, 2007).

NO + O2 **∙ -** → ONOO-

ONOO- + H+→ ONOOH

ONOOH → NO2 + OH**·**

## 2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikal kaynakları başlıca endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir.

### 2.2.1. Endojen Kaynaklar

Canlı fizyolojisinde normal şartlarda gerçekleşen pek çok hücresel aktivite oksidan oluşumuna yol açmakta ve bunlar endojen kaynakları oluşturmaktadır.

#### 2.2.1.1. Mitokondriyal elektron transportu

Oksidatif fosforilasyon sonucunda ATP oluşurken, ara ürün olarak H2O2, O2 ∙ - ve OH· radikali salınmaktadır. Moleküler oksijenin % 98’i mitokondrial enzim olan *sitokrom C oksidaz* tarafından H2O2’ya redüklenir. Elektron transport zincirinden oluşan elektron sızıntısı, hücrelerdeki en büyük serbest radikal kaynağıdır. Radikalin oluştuğu iç mitokondrial membranda lokalize oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenlerinin büyük oranda indirgenmesiyle mitokondrial O2 ∙ - radikal üretimi artmaktadır. İç mitokondrial membranda üretilen başta O2**∙-** radikaliolmak üzere H2O2 ve OH**·** radikali mitokondrial oksijen tüketiminin yaklaşık % 1-2’sini oluşturmaktadır. Sağlam mitokondri H2O2’i sitoplazmaya verdiği halde O2**∙-** radikali için durum farklıdır. Süperoksit radikali mitokondri içindeki SOD aracılığı ile H2O2 ve OH**·**’e dönüşerek H2O açığa çıkmasıyla bir yere kadar hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (Mansouri ve ark, 2006; Peng ve ark, 2006). Moleküler O2’den reaktif ara ürünlerin oluşumu aşağıda yer alan tepkimede gösterilmiştir.

 O2 e- O2∙- e- +2H+ H2O2  e- +H+ OH· e- +H+ H2O

 H2O

#### 2.2.1.2. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda elektron transport sistemleri

Endoplazmik retikulum ve nükleusun iç membranları, sitokrom P450 (CYP450) yönünden zengindir ve serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanmaktadır (Liu ve ark, 1999). Bu sistem doymamış yağ asitlerini ve ksenobiyotikleri okside edebilmekte, flavoprotein içeren *sitokrom redüktaz*lar otooksidasyonla H2O2 ve O2**∙-**  radikalini oluşturmaktadır (Kavas, 1989).

#### 2.2.1.3. Peroksizomlar

Peroksizomlar uzun zincirli yağ asitlerinin yıkılmasından sorumlu organellerdir ve içinde bulundurdukları *D-amino asit oksidaz*, *ürat oksidaz*, *L-hidroksil asit oksidaz* ve yağ *asiti açil-CoA oksidaz* gibi *oksidaz*ların O2**∙-** radikali üretmeden H2O2 üretimine sebep olmasından dolayı hücre içi H2O2’in çok önemli bir kaynağıdır (Akkuş, 1995). Ancak H2O2’i katalizleyen CAT enziminin aktivitesinin çok yüksek olmasından dolayı peroksizomlardan sitozole H2O2’in ne kadar geçtiği bilinmemektedir (WEB\_1).

Bir hem proteini olan CYP450 ksenobiyotiklerin ve birçok endojen bileşiğin hidroksilasyonunu katalize etmektedir. Bu katalizleme sırasında oksijen kaynağı olarak peroksitleri (ROOH) de kullanabildiği için *peroksidaz* gibi etki etmektedir (Liu ve ark, 1999).

#### 2.2.1.4. Plazma membranları

Plazma membranları serbest radikallerin harabiyetine açık fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler, doymamış yağ asitleri, kolay okside olan amino asitleri içeren transmembran proteinlerini içermektedir. Serbest radikaller ekstrasellüler olarak açığa çıkar ve hücrenin diğer organelleri ile reaksiyona girmesi için plazma membranlarını geçmeli ya da toksik olan reaksiyonlarını membranda başlatmalıdır. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonu sekretuvar fonksiyon kayıplarına, transmembran iyon dengesinin bozulmasına ve hücresel metabolik olayların inhibisyonuna yol açmaktadır (Niki, 1987).

#### 2.2.1.5. Otooksidasyon

Oleik, linoleik ve linolenik gibi doymamış yağ asitlerinin yapısında bulunan H’in ayrılmasıyla oluşan serbest radikalin, O2 birleşip ROOH radikali meydana getirerek başlattığı ve devamında oksidasyonun sürekli devam ettiği radikal zincir reaksiyonuna otooksidasyon denilmektedir. Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinlerin otooksidasyonu sonucunda primer olarak O2**∙-** radikallerinin meydana gelmesine neden olmaktadırlar. Süperoksit radikallerinin kendiliğinden ya da enzimatik dismutasyonu ile H2O2 açığa çıkmaktadır (Akkuş, 1995).

#### 2.2.1.6. Enzimler ve proteinler

Birçok enzimin katalitik döngüsü esnasında serbest radikaller açığa çıkmaktadır. *Ksantin oksidaz* bu enzimlerden biridir. Normalde nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) bağımlı *dehidrogenaz* olarak etki gösterdiği için serbest radikal kaynağı değildir. Ancak; *in vivo* olarak oluşturulan iskemi sonrası enzimin *dehidrogenaz* formundan *oksidaz* formuna dönüşmesi sayesinde O2**∙-** radikalinin kaynağı olmaktadır (Akkuş, 1995).

*Ksantin oksidaz*a yapı itibari ile benzeyen ve substratlarının çoğu aynı olan *aldehit oksidaz* da O2**∙-** radikali üretmektedir. *Dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz* ve *triptofan dioksijenaz* gibi enzimler de serbest radikal üretimine sebep olmaktadırlar (Akkuş, 1995).

#### 2.2.1.7. Araşidonik asit metabolizması

Araşidonik asit metabolizması önemli bir serbest radikal kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, *protein kinaz* ve *fosfolipaz*ın aktivasyonuna ayrıca plazma membranlarından araşidonik asitin salınmasına sebep olmaktadır. Salınan araşidonik asitin oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünlerini meydana getirmektedir. Bu ara ürünlerin üretimine enzimatik lipid peroksidasyonu denir (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller ve prostoglandin (PG) mekanizması birbirleri ile yakından bağlantılıdırlar. *Fosfolipaz* aktivasyonu yoluyla reaktif oksijen metabolitleri prostoglandin E2, prostoglandin F2, 6-keto prostoglandin F1α ve tromboksan B2 sentezini sağlamaktadırlar. Prostoglandin E2 ve I2 *adenilat siklazı* aktive ederek siklik adenozin monofosfat (sAMP) sentezini artırılar. Aynı etkiyi O2**∙-** radikalinin de göstermesi ROS’nin sAMP’yi PG sentezi yolu ile arttırdığını göstermektedir (Liu ve ark, 1999).

#### 2.2.1.8. Geçiş metalleri

Başta Fe ve Cu olmak üzere geçiş metalleri yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarında görev almaktadırlar. Bu sebeple serbest radikal oluşum mekanizmalarını hızlandırarak katalizör vazifesi görmektedirler. Fakat asıl önemleri lipid peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri sentezlenmiş olan lipid peroksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize etmesinden dolayı daha az zararlı olan serbest radikallerin daha zararlı hale gelmesine sebep olmaktadırlar (Diplock, 1998).

#### 2.2.1.9. Fagositoz ve solunumsal patlama

Fagositik lökositer hücreler birçok çeşidi olan biyolojik maddelerin parçalanarak hasara uğramasına ve vücudun hücresel boyutta cevap vermesine sebep olan hücrelerdir. Fagositik hücreler çözünebilir ya da partiküler bir uyaranın (mikroorganizmalar, kompleman fragmanı C5a, lökotrien B4 gibi) ardından lizozomal komponentlerini dışarıya vermeye başlarlar. Bunun sonucunda reaktif oksijen metobolitlerini oluşturarak mitokondri dışındaki oksijen tüketiminde bir patlama göstermektedirler. Patlamanın ürünleri olan O2∙- anyonu, H2O2 ve OH∙ radikalitoksik etkileri ile fagosite edilmiş bakteriyi öldürmektedirler (Şekil 1).



Şekil 1. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri (WEB\_1).

NADPH: Adenin dinükleotit fosfat, NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, HOCl: Hipokloröz asit, H2O2: Hidrojen peroksit, O2∙-: Süperoksit radikali, OH∙: Hidroksil radikali, SOD: Süperoksit dismutaz

Solunumsal patlamadan sorumlu enzim olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), plazma membranlarının dış yüzeyinde olan bir ektoenzimdir. NADPH aşağıdaki tepkimeye göre moleküler oksijenin solunumsal patlama esnasında elektron vericisi olarak kullanılarak O2∙- radikalini indirgeyerek nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) üretimini arttırır ve heksoz monofosfat yolu aktive edilmiş olur (Mates ve ark, 1999).

2O2 + NADPH *NADPH oksidaz* 2O2 ∙ - + NADP+ + H+

Süperoksit ara ürünü de aşağıda belirtildiği gibi fagositlerce bakterisidal ajan olarak kullanılmak üzere H2O2’edönüştürülür (Maddipati ve Marnett, 1987).

2O2∙ - + 2H+ → O2 + H2O2

NADP’nindiğer bir kaynağı, H2O2’in detoksifikasyonundan sorumlu *glutatyon peroksidaz-gulutatyon redüktaz* sistemidir (Maddipati ve Marnett, 1987).

2GSH + H2O2 *glutatyon peroksidaz*GSSG + 2H2O2

GSSG + NADPH +H+ *glutatyon redüktaz* 2GSH + NADP+

### 2.2.2. Ekzojen Kaynaklar

Canlı organizmanın yaşamı boyunca dışarıdan aldığı ya da maruz kaldığı kaynaklar ekzojen kaynakları oluşturmaktadır. Çevre kirliliği, sigara tüketimi, iyonizan radyasyon, pestisidler, mikotoksinler ve ilaçlar ekzojen kaynaklara örnektir (Delibaş ve Özcankaya, 1995).

Toksik maddeler de doğrudan serbest radikal üretebilmekte ya da antioksidan aktivitede düşüşe sebep olmaktadırlar. Ekzojen kaynaklara lipid peroksidasyonunu başlatan kirli havanın sorumlusu olan azot dioksit, karbontetraklorürün (CCl4) sitokrom P450 tarafından karaciğerde triklorometile dönüştürülmesi ve triklorometilin oksijenle reaksiyonundan sonra oluşan parakuatın karaciğerde yükseltgendikten sonra oluşan oksijnin de indirgenmesi sonucu oluşan O2∙- anyonu, parasetamolün sitokrom P450 ile metabolizması sonucunda oluşan N-asetil para-benzokuinonimin GSH tüketimini arttırması örnek olarak verilebilir (Lykkesfeldt ve Svendsen, 2006).

## 2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Endojen ve ekzojen olarak oluşan serbest radikaller Şekil 2’de gösterildiği gibi hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli ana bileşenlerine etki etmektedirler (Akkuş, 1995).



Şekil 2. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat ve ark, 2002).

RER: Granüllü endoplazmik retikulum, SER: Granülsüz endoplazmik retikulum, DNA: Deoksiribo nükleik asit, O2∙ -: Süperoksit radikali, , OH∙: Hidroksil radikali, Na: Sodyum, Ca: Kalsiyum, H2O: Su

### 2.3.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin metabolizmaya verdiği zararlara karşı en hassas yapı lipitlerdir. Serbest radikallerin membranda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağlarıyla reaksiyonu soucunda peroksidasyon ürünü oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonu olarak bilinen ve oldukça zararlı olan reaksiyonlar aslında poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. Kendiliğinden devam eden zincir reaksiyonunun lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu nörojenik hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarı ve diyabet gibi birçok hastalıkta etkili olduğu doğrulanmıştır (Lovell ve ark, 1995).

Lipid peroksidasyonu, oluşan serbest radikal varlığı ile membrandaki poliansatüre yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ve bu yağ asidi zincirinin lipid radikal (L∙)özelliği kazanması ile başlamaktadır. Dayanıksız ve bir dizi değişikliğe uğrayan lipid radikalinin moleküler oksijenle reaksiyonundan lipid peroksit radikali oluşmaktadır (LOO∙). Lipid peroksit radikalinin membrandaki poliansatüre yağ asitleriyle yeni lipid radikalleri oluşturarak bir yandan kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarıyla lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Bu şekilde reaksiyonlar kendi kendini katalizleyerek devam eder (Lobo ve ark, 2010).

Geçiş metalleri LOOH’ni yıktığında çoğu aktif olan aldehitler oluşmakta ve bu oluşan aldehitler ya hücrede metabolize olmakta ya da hücre hasarına sebep olmaktadırlar. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan malondialdehit (MDA) üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu olmakla birlikte lipid peroksitlerinin ölçülmesinde çoğunlukla kullanılmaktadır. Artan MDA miktarının mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkileri bulunmaktadır (Akkuş, 1995).

### 2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitler serbest radikallerden etkilenmektedirler. Çünkü bu aminoasitler doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerdir. Reaksiyonları sonucunda özellikle karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelmekte ve immünglobülin G ve albümin gibi disülfit bağı bulunduran proteinlerin yapılarını bozarak fonksiyonlarını yerine getirmelerini engellemektedirler (Freeman ve Crapo 1982).

### 2.3.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA’ya Etkileri

İyonize radyasyon sonucunda meydana gelen serbest radikaller DNA’yı etkileyerek hücrede mutasyona ve hücrenin ölümüne sebebiyet vermektedir. Deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona giren OH**·** radikali ve H2O2, DNA hasarına hatta hücre ölümlerine sebep olabilmektedirler (Willcox ve ark, 2004).

### 2.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Karbonhidrat metabolizması serbest radikallerden etkilenerek organizmada çeşitli sorunlar oluşturmaktadır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile ROOH, H2O2 ve okzoaldahitler meydana gelmekte ve bunlar da kanser, yaşlanma gibi olaylarda rol almaktadırlar (WEB\_1). Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkariti olan hyalüronik asit H2O2 ve O2∙- radikali tarafından parçalanarak eklem hastalıklarına yol açmaktadır. Aynı zamanda gözün humor vitreususunda da bulunan hyalüronik asitin serbest radikallerle hasarı sonucunda katarakt oluşmaktadır (Akkuş, 1995).

## 2.4. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşmasını veya bunların ortaya çıkardığı toksik etkileri önlemek serbest radikalleri yakalama ve onları etkisiz hale getirme kabiliyetinde olan maddelere antioksidan adı verilir (Elliot, 1999). Antioksidanlar 4 farklı şekilde etki etmektedirler (Akkuş, 1995).

1. Toplayıcı etki: Antioksidanların serbest oksijen radikallerini tutarak yeni ve daha zayıf moleküle dönüştürmesi toplayıcı etki olarak adlandırılmaktadır. Küçük moleküller, trakeobronşial mukus ve antioksidan enzimler buna örnek gösterilmektedir.
2. Baskılayıcı etki: Baskılayıcı etki antioksidanların reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girmesi ve hidrojen aktararak bunların etkilerini azaltması veya etkisiz hale getirilmesidir. Vitaminler, antosiyanoidler, flavanoidler ve trimetazin bu etkiye sahip olanlardandır.
3. Zincir kırıcı etki: Antioksidanların serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlaması ve ardından zincirlerini kırarak radikallerin fonksiyonlarının engellenmesi zincir kırıcı etkidir. Mineraller, seruloplazmin ve hemoglobin zincir kırıcı etki göstermektedir.
4. Onarıcı etki: Antioksidanlar tarafından serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği hasarın onarılması onarıcı etki olarak adlandırılmaktadır.

Antioksidanlar Şekil 3’te görüldüğü gibi hücrenin birçok organalinde meydana gelen oksidatif hasarı en aza indirmek için etki etmektedir.



Şekil 3. Antioksidanların hücredeki etkileri (Engin, 2007).

RER: Granüllü endoplazmik retikulum, SER: Granülsüz endoplazmik retikulum, DNA: Deoksiribo nükleik asit, SOD: Süperoksit dismutaz, GSH: Glutatyon, GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

Antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir.

### 2.4.1. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar organizmada doğal olarak bulunan savunma sistemidir. Enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere ikiye ayrılır (Akagün, 2009).

#### 2.4.1.1. Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar SOD, CAT, GSH-Px, *glutatyon-S-transferaz* (GST), GSSG-R, *hidroperoksidaz* ve *mitokondrial sitokrom oksidaz*dır. Organizmada en etkili olanları SOD, CAT ve GSH-Px’tir (Cheeseman ve Slater, 1993).

##### 2.4.1.1.1. *Süperoksit dismutaz*

 Endojen olarak üretilen SOD enzimi organizmanın ilk karşılaştığı O2∙-  radikalini H2O2 ve moleküler O2 çevirmektedir. SOD sayesinde organizmadaki O2∙-  düzeyleri aşağıda yer alan tepkimede görüldüğü gibi kontrol altında tutulmaktadır (Halliwell, 1994)

2O2∙- + 2H+ SOD H2O2 + O2

##### 2.4.1.1.2. *Katalaz*

*Katalaz* karaciğer ve eritrositlerde yüksek iken beyin, kalp ve iskelet kaslarında düşük miktarlarda bulunmaktadır. Aşağıdaki tepkime *katalaz*ın H2O2’i moleküler O2’ne indirgediğini göstermektedir. SOD aktivitesinin CAT aktivitesi artmadan yükselmesi H2O2 birikerek OH**·** radikallerinin oluşmasına sebep olmaktadır (Garewal, 1997).

 H2O2 katalaz  2H2O + O2

##### 2.4.1.1.3. *Glutatyon peroksidaz*

Sitozolik bir enzim olan GSH-Px H2O2’i moleküler H2O ve GSSG’a indirger, ayrıca hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumludur ve lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engellemektedir.

H2O2 + 2GSH  GSH-Px GSSG + 2H2O

ROOH+ 2GSH  GSH-Px GSSG + ROH + H2O

Oluşan GSSG’un aktif hale geçebilmesi için tekrar indirgenmesi gerekmektedir. İndirgenmezse GSSG’un artışı oksidatif stres belirtecidir (Seven ve Candan, 1996).

#### 2.4.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar

Nonenzimatik antioksidanlar endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Endojen antioksidanlar melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin ve glutatyondur. Ekzojen antioksidanlar ise askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini) ve β karotendir (Lobo ve ark, 2010). Nonenzimatik ekzojen antioksidanların çoğu fenolik bileşiklerdir ve en önemlileri askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidlerdir (Yavaşer, 2011).

##### 2.4.1.2.1. Askorbik asit (Vitamin C)

Suda eriyebilen vitaminlerden olan askorbik asit yeşil sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunmakta ve ince bağırsaklardan kolayca emilmektedir. Suda çözünebildiği için özellikle detoksifikasyon sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerini ortadan kaldıran redükte edici bir ajandır. Ayrıca suda çözünmesinin bir başka sonucu idrarla atıldığı için vücutta depolanamamasıdır (Carr ve ark, 2000).

##### 2.4.1.2.2. α-Tokoferol (Vitamin E)

Vitamin E etkinliği gösteren sekiz doğal tokoferol izomeri bulunmaktadır. En yaygın ve en aktif olarak bulunan ise α-tokoferol yani E vitaminidir. E vitamini oksijen bulunmayan ortamlarda asit ve sıcaklığa dayanıklı olmasının yanı sıra yağda çözünmektedir. Serbest radikallerin eşleşmemiş elektronları ile reaksiyona giren ve indirgeyebilen hidroksil grubu içermektedirler ve zincir kırıcı özelliği sahiptirler (Antmen, 2005). E vitamininin antioksidan olarak görevi membranda bulunan fosfolipitlerin peroksidasyonunun ve hücre membranının zarar görmesinin önüne geçmektir (Gey ve ark, 1991). E vitamini O2∙-, OH∙, 1O2 ve diğer radikalleri indirgemekte ve GSH-Px ile serbest radikallere karşı tamamlayıcı etki göstermektedirler (Akkuş, 1995).

##### 2.4.1.2.3. Karotenoidler

Karotenoid familyasında en önemli alt üye A vitaminin metabolik ön maddesi olan β-karotendir. β karoten meyveler, sebzeler ve yeşil yapraklı bitkilerde bulunan kırmızı-portakal renkli bir pigmenttir. Duodenumda emilir ve yağ dokusunda depolanır. β karoten bozulmadan 1O2 baskılar ve ROO∙, OH∙ ve O2∙- radikalleri gibi serbest radikallerle reaksiyona girer. Karotenoidlerin DNA, lipid ve proteinlere karşı oksidatif hasarı önlediği veya azalttığı bildirilmiştir (Agarwal ve ark, 2012; Chapman, 2012 ).

### 2.4.2. Sentetik Antioksidanlar

Gıdaların depolanması, ısıl işlem görmesi ve sindirimi sonucunda lipid serbest radikallerin miktarı artmaktadır. Antioksidan maddeler ise lipid peroksidasyonunu geciktirmekte ya da önlemektedirler. Bu nedenle gıda sanayinde tat, renk, koku ve kalitesini korumak ve raf ömrünü uzatmak için çeşitli gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bu antioksidanlar sentetik antioksidanlar olarak adlandırılmaktadırlar. En çok kullanılan sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ), gallatlar ve nordihidroguareyetik asit (NDGA)’tir.

Yavaşer (2011), yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular doğrultusunda, sentetik antioksidanların toksik etkili ve yüksek maliyetli olduğunu bildirmektedir. Ayrıca besinlerlerle alınan doğal antioksidanlardan daha az etkili oldukları görülmektedir. Sentetik antioksidanların bahsedilen dezavantajları sebebiyle günümüzde besin ve ilaçlardaki kullanımı yasal olarak sınırlandırılmaktadır (Yavaşer, 2011).

##

## 2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, Şekil 4’te gösterildiği üzere oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hücresel veya bireysel seviyedeki dengenin oksidanlar lehine değişmesi olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif hasar böyle bir dengesizliğin sonucudur ve hücresel makromoleküllerin oksidatif modifikasyonunu, apoptoz veya nekrozla hücre ölümünü ve yapısal doku hasarını içermektedir (Burnaz, 2013).



Şekil 4. Oksidatif stresin şematik gösterimi (Burnaz, 2013).

Oksidanlara karşı savunmanın ilk seviyesi olan hücre, antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır. Antioksidanlar elektronlarını oksidanlara eşleştirebilirler, böylece kontrollü koşullar altında reaktivitelerini söndürürler ve onları hücresel makromoleküllere çevirirler yani zararsız hale getirirler. Antioksidanlar kendiliğinden radikaller haline gelir, ancak bunlar çok daha kararlıdır ve hücresel hasar oluşturamamaktadırlar (Lykkesfeldt ve Svendsen, 2006).

Oksidatif strese karşı çeşitli tedaviler önerilmektedir. Fakat oksidatif hasara sebep olan oksidan ve antioksidan dengesindeki bozukluğun düzeltilmesi ana hedef olmaktadır. Bu sebeple gerek beşeri gerekse veteriner hekimlikte hasta ve sağlıklı bireylerde koruyucu ya da tedavi amaçlı antioksidanların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Antioksidanların moleküler olarak birçok çeşidi bulunmakta, miktarı ve dağılımları değişmektedir. Kendi içlerinde bile antioksidanların etki dereceleri farklılık gösterebilmektedir. Bu sebeple miktarları ve dağılımlarını anlamak için antioksidan tayin yöntemlerinin geliştirilmesi ve karşılaştırılması son zamanlarda en önemli araştırma konularından birisi haline gelmiştir. Bu tür araştırmalar yüksek antioksidan aktivite gösteren molekülleri içeren bitkisel kaynaklı besinlerin ya da yapay bileşiklerin klinik kullanımda önerilmesi açısından büyük önem arz etmektedir (Ardağ, 2008).

## 2.6. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Canlı fizyolojisinin nefes alırken dahi meydana getirdiği oksidanlar oksidatif strese ve dolaysıyla oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu nedenle son yıllarda antioksidanlara olan ilgi oldukça artmıştır. Antioksidanların ne kadar etkili olduğunu belirlemek, kendi aralarında etki kıyaslamasını yapmak veya tüketilen besin maddelerinin ne derecede antioksidan etkili olduğunu araştırmak için çeşitli antioksidan kapsite tayin yöntemleri mevcuttur. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri genel olarak Hidrojen Atom Transferi’ni (HAT) temel alan analizler ve Elektron Transferi’ni (ET) temel alan analizler olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir. HAT’ni temel alan analizler antioksidanın serbest radikalleri hidrojen bağışı ile söndürme potansiyelini ölçer (Prior ve ark, 2005). HAT’a dayanan metodlar genellikle sentetik bir radikal üretici, yükseltgenebilir molekül ve bir antioksidan bileşikten oluşmaktadır (Büyüktuncel, 2013). HAT’ni temel alan analizlerin birçoğu peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde temizlenmesi esasına dayanmaktadır. Başlıca HAT analiz yöntemleri (Ardağ, 2008):

a) Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi

b) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)

c) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)

d) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonudur.

ET’ni temel alan analizler ise bir reaksiyon karışımında oksidan ve antioksidan olmak üzere iki bileşen içermektedir. Oksidan antioksidandan bir elektron alması sonucunda oksidanda renk değişimi meydana gelmektedir. Antioksidanın derişimi, renk değişim derecesi ile orantılıdır (Huang ve ark, 2005). Başlıca ET analiz yöntemleri (Ardağ, 2008):

a) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü

b) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi

c) Bakır (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi

d) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü

e) Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi

f) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemidir.

Bu çalışmada antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi kullanılmıştır.

### 2.6.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

DPPH radikali, birkaç kararlı organik azot radikallerinden biridir. Ticari olarak bulunur ve koyu mor menekşe rengindedir. Yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından DPPH radikallerinin antioksidan moleküllerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Brand-Williams ve arkadaşları (1995) yöntemi geliştirerek birçok araştırmacıya referans olmuştur.

Yöntem DPPH solüsyonunun hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile elektronunun yer değiştirmesi sonucunda başlangıçtaki mor menekşe renginin kaybı ile 517 nm’de sarı renkli indirgenmiş form oluşmasına dayanmaktadır. DPPH radilakilinin yapısı ve antioksidan ile vermiş olduğu reaksiyon sonunda oluşan indirgenmiş formu Şekil 5’te gösterilmiştir. Antioksidan özelliği araştırılan maddenin DPPH ile reaksiyon hızı farklı olmaktadır. Bunun nedeni kimyasal yapısındaki hidroksil grubu ve molekül büyüklüğü ile ilgilidir (Brand-Williams ve ark, 1995).



 DPPH İndirgenmiş DPPH

Şekil 5. DPPH radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon (Yavaşer, 2011).

Bu yöntemde farklı örnek konsantrasyonları ile reaksiyona sokulan DPPH’in absorbansındaki değişim ölçülerek konsantrasyona karşılık gelen absorbans grafiği çizilir. Grafikten elde edilen y=ax+b eğim denkleminde DPPH derişimini yarıya düşüren örnek miktarı μg/mL cinsinden belirlenmekte ve etkin konsantrasyon 50 (EC50) değeri olarak ifade edilmektedir. Başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunun % 50 azalması için kullanılan antioksidan miktarı EC50 değeri olarak ifade edilir (Brand-Williams ve ark, 1995).

DPPH yönteminin avantajları:

DPPH basit ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Tekrarlanabilir ve doğru sonuçlar vermektedir (Perez-Jimenez ve ark 2008). Yalnızca UV spektrofotometresine ihtiyaç duyar. Çok sayıda örnek analizi yapılması durumunda mikroplaka kullanılabilmektedir (Fukumoto ve Mazza, 2000).

Dezavantajları ise:

DPPH yalnızca alkol ortamında çözünebilir, sulu ortamda çözünmez. Bu hidrofilik antioksidanların antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesinde önemli bir sınırlamadır (Arnao, 2000). Gıdaların ve fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak; ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Metanol ve aseton içindeki DPPH çözeltisinin 517 nm’deki absorbansı 120 dakikalık süre boyunca ışık altında % 20 ve % 35 azalma göstermiştir. Karanlıkta ise 150 dakika süre boyunca önemli bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Özcelik ve ark, 2003).

DPPH çözeltisini hazırlamak için kullanılan çözücünün su içeriği bu yöntem için antioksidanların kapasitesini azaltan önemli bir sınırlamadır. Sulu çözücülerde DPPH’ın bir kısmının koagüle olması sonucunda antioksidanlarla kolay reaksiyona girememektedir (Magalhaes ve ark, 2008). DPPH, canlı organizmalarda bulunan radikallerin tersine kararlı, uzun ömürlü bir azot radikalidir. Küçük moleküller DPPH radikaline daha kolay ulaşabildikleri için daha yüksek antioksidan kapasite değerlerine sahiptirler (Huang ve ark, 2005). Ayrıca antioksidan madde ile DPPH arasındaki reaksiyon kinetiğinin DPPH derişimi ile her zaman doğrusallık göstermediği de bilinmektedir (Molyneux, 2004).

## 2.7. Radikal Süpürme Kapasitesi Araştırılan Antioksidanlar

Çalışma kapsamında DPPH radikal süpürme kapasitesi yöntemiyle vitamin C, vitamin E, kuarsetin, ellagik asit, resveratrol, kurkumin ve silimarinin antioksidan aktivitesi ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır.

### 2.7.1. Vitamin C

Altı karbonlu bir lakton olan vitamin C bazı memelilerde karaciğer ya da böbreklerde glikozdan sentezlenir. Turunçgiller, elma, domates ve yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır. Vitamin C hücre membranına bağlı olan vitamin E’nin rejenerasyonunu sağlamakta olup tokoferoksili α-tokoferole dönüştürmektedir. Bu nedenle hayvanlara dışarıdan verilmesi durumunda plazma ve dokudaki vitamin E seviyesi artmaktadır. Tek başına pro-oksidan olan vitamin C Cu ile Fe tuzları için indirgeyici olarak da görev yapmaktadır (Proteggente ve ark, 2000). Vitamin C yapısındaki ikinci ve üçüncü karbonlar arasında çift bağdan iki elektron vermektedir. Elektronlarını vermesi sonucunda proteinlerin ve diğer hücresel bileşiklerin okside olmasını önlediği hipotezinden yola çıkarak diyetle alınan C vitamini alımının arttırılması gerektiği vurgulanmıştır (Ames, 1998).

###

### 2.7.2. Vitamin E

Tokoferollerden olan ve doğada yaygın bulunan α-tokoferol (vitamin E) antioksidan ve yağda çözünen bir vitamindir. Yağlarda, fındıkta, çimlenen tohum ve tahıllarda bulunmakta ve esansiyel olduğu için vücuda dışarıdan alınmaktadır. Bir vitaminden çok antioksidan olarak anılmaktadır. H2O2 lipid peroksillerini lipid hidroperoksidlerine dönüştürür. Lipid hidroperoksidler de hücre hasarına, lipid peroksidasyonuna, MDA ve etan oluşumu sonucunda hücre ölümüne yol açarlar. α-tokoferol bu reaksiyonu engeller yani lipid peroksillerinin lipid hidroperoksidlerine dönüşümünü engeller ve vitamin C ise oluşan tokoferoksili tekrar α-tokoferole dönüştürür (Çaylak, 2011).

### 2.7.3. Kuarsetin

Kuarsetin, flavonoid ailenin en seçkin bileşiklerinden biridir. Sebze, meyve, kırmızı şarap, çay ve diğer bitki kökenli içeceklerde yaygın olarak bulunmaktadır. Birçok *in vitro* çalışmalarda flavonoidlerin ROS’nin doğrudan yakalanması, süperoksit anyon üretiminden sorumlu enzimlerin inhibisyonu, reaksiyona giren geçiş metali iyonlarının şelatlanması gibi çeşitli yollarla antioksidan olarak hareket edebileceğini göstermektedir (An ve ark, 2010).

### 2.7.4. Ellagik asit

Doğal polifenolik bir antioksidan olan ellagik asit ahududu, çilek, yaban mersini, nar ve cevizde yüksek miktarda bulunmaktadır. Güçlü bir antioksidandır (Padma ve ark, 2014). Ellagik asitin O2∙- ve OH∙ radikallerine karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Iino ve ark. (2001) yaptığı çalışmada ellagik asitin etanola karşı midenin mukosal korunumunu sağladığını bildirmişleridir. Ellagik asitin gıda ürünlerinde lipid oksidasyonunu en aza indirgemek veya önlemek, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu geciktirmek, beslenme kalitesini korumak, gıdalar ve farmasötiklerin raf ömrünü uzatmak, oksidasyonun geciktirilmesi, engellenmesi veya önlenmesi için kullanılabileceği bildirilmiştir (Kılıç ve ark, 2014).

### 2.7.5. Resveratrol

Polifenolik bileşiklerden bir diğeri olan resveratrolün trans-resveratrol ve cis-resveratrol olmak üzere başlıca iki formu bulunmaktadır. Asma, dut, yaban mersini, yer fıstığı ve antep fıstığında bulunmaktadır (Saldanha ve ark, 2013). Resveratrolün anti-karsinojenik, anti-inflamatuvar, anti-trombojenik, nöroprotektif özelliklerinin yanı sıra, insülin duyarlılığını arttırdığı, yaşam süresini uzatabileceği ve enerji metabolizmasını düzenlemeye yardımcı olduğu bildirilmiştir (Clapier, 2012). Resveratrolün demir-ferrozin kompleksinin oluşumuna müdahale ederek şelatlama aktivitesine sahip olduğu ve ferrozinden önce Fe iyonunu yakalayabildiği böylece oksidatif stresi önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (Gülçin, 2010).

####

### 2.7.6. Kurkumin

Kurkumin *Zingiberaceae* familyasına ait, sarıçiçekli ve büyük yapraklı *Curcuma longa* (Zerdeçal) bitkisinden elde edilen polifenolik bir yapıya sahip olan antioksidan özellik gösteren bir maddedir. Kurkuminin lipid peroksidasyonunu engellediği, OH∙ radikalleri ile azotdioksit (NO2) radikalleri içeren farklı reaktif oksijen türlerinin etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Reddy ve Lokesh, 1994). Kurkuminin karbonil ve hidroksil fonksiyonel gruplar vasıtasıyla Fe iyonlarını bağladığı belirtilmiştir (Ak ve Gülçin, 2008)

### 2.7.7. Silimarin

Silimarin *Silybum marianum* (devedikeni sütü)’un aktif komponenti olup bir flavonoittir. Silibinin, silidianin ve silikristin olmak üzere üç yapısal bileşenden oluşan bir karışımdır. Silimarin suda çözünmeyen bir bileşik olup radikal temizleme özelliğine sahiptir. Antioksidan özelliğinden dolayı farmakolojik ve gıda endüstrisinde kullanımı artmaktadır (Köksal ve ark, 2009). Silimarinin membran permeabilitesini düzenlediği, hücre içi GSH düzeyini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Bosisio ve ark, 1992; Valenzuella ve Garride,1994).

*In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda üretici firmalar tarafından sentetik olarak hazırlanan antioksidanlar kulanılmaktadır. Antioksidanların veya tüketilen besin maddelerinin ne derecede antioksidan etkili olduğunu belirlemek için çeşitli antioksidan kapsite tayin yöntemleri bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı vitamin C, trolox, ellagik asit, kuarsetin, kurkumin, resveratrol, silimarin ve vitamin E’nin antioksidan aktivitelerini DPPH antioksidan kapasite tayin yöntemi belirlemek ve karşılaştırmaktır.

# 3. GEREÇ ve YÖNTEM

## 3.1. Gereç

### 3.1.1. Kimyasallar

Çalışma kapsamında; metanol (% ≥ 99.7, Sigma-Aldrich 24229), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich D9132), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma-Aldrich 238813), α-tocopherol (Sigma-Aldrich 258024), silymarin (Sigma-Aldrich S0292), curcumin (Sigma-Aldrich C1386), ellagic asit hydrate % 97 (Alfa Aesar A15722), L-(+)-ascorbic acid (Alfa Aesar 11188), quercetin hydrate (Alfa Aesar A15807), resveratrol (Santa Cruz Biotechnology sc200808) kullanıldı.

### 3.1.2. Cihazlar, Araç ve Gereçler

Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalın’da bulunun spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), buzdolabı/derin dondurucu (Samsung RL62ZBSW), distile su cihazı (Nüve NS 112), etüv (Nüve FN 500), vortex (Nüve NM 110), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Nüve MK 418), terazi (Shimadzu EB-2200 HU) ve hassas terazi (Shimadzu AX120) kullanıldı.

Çalışmada araç ve gereç olarak mikropipetler (Eppendorf 10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl), balon joje (Isolab 10, 25, 50, 100 ml), farklı boyutlarda deney tüpü (Isolab 5, 10, 15 ml), beher glas (Isolab 10, 25, 50, 100 ml) ve pudralı cerrahi eldiveninden (Beybi) yararlanıldı.

## 3.2. Yöntem

DPPH radikal süpürücü aktivite tayini Brand–Williams ve ark. (1995)’na göre modifiye edilerek yapıldı. Yöntemin işlem basamakları aşağıda sıra ile belirtilmiştir;

- DPPH çözeltesi analiz öncesi taze olarak hazırlandı. Buna göre 10-4 M DPPH’ın metanoldeki çözeltisinden 1 ml alındı ve alüminyum folyo kaplı cam tüpe aktarıldı.

- DPPH çözeltisi üzerine 3 ml metanolde hazırlanmış 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml antioksidan örnek çözeltileri ilave edilerek vortekslendi.

- Kontrol tüplerine ise 3 ml antioksidan çözeltisi yerine saf metanol eklendi.

- 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda metonele karşı okundu.

- Standart olarak askorbik asit ve troloks kullanıldı (Somparn ve ark, 2007; Jadhav ve ark, 2009; Mishra ve ark, 2012).

Analizler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Yani ilgili antioksidanların 3 ayrı tartımı yapılarak tekrar edildi.

DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

% İnhibisyon = [AK - AÖ / AK] x 100

AK: Kontrol absorbansı

AÖ: Örneğin absorbansı

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten linear regrasyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edildi ve sonuçlar EC50 (µg/ml) olarak ifade edildi.

# 4. BULGULAR

Kararlı bir serbest radikal olan DPPH bir elektron veya hidrojen radikalini almaktadır. DPPH yönteminde 517 nm’de okunan absorbans değerleri ne kadar düşük ise serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. DPPH miktarındaki azalma ile antioksidan miktarın belli bir konsantrasyona kadar azalan absorbans değerleri doğru orantılıdır (Ndhlala ve ark, 2010). Absorbansın düşmesinin sebebi antioksidan ile serbest radikal arasındaki hidrojen alışverişi sonrasında serbest radikalin giderilmiş olmasıdır. Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan DPPH radikalini süpürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 6-13).

Şekil 6. Farklı konsantrasyonlardaki vitamin C’nin % inhibisyon değerleri.

Şekil 7. Farklı konsantrasyonlardaki troloxun % inhibisyon değerleri.

 Şekil 8. Farklı konsantrasyonlardaki ellagik asitin % inhibisyon değerleri.

Şekil 9. Farklı konsantrasyonlardaki kuarsetinin % inhibisyon değerleri.

Şekil 10. Farklı konsantrasyonlardaki kurkuminin % inhibisyon değerleri.

Şekil 11. Farklı konsantrasyonlardaki resveratrolün % inhibisyon değerleri.

Şekil 12. Farklı konsantrasyonlardaki silimarinin % inhibisyon değerleri.

Şekil 13. Farklı konsantrasyonlardaki vitamin E’nin % inhibisyon değerleri.

Grafiklerden hesaplanan EC50 değerleri ne kadar düşükse DPPH radikalini süpürme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. Buna göre çalışma kapsamında kullanılan antioksidanların EC50 değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılan incelenen antioksidan bileşiklerin EC50 değerleri.

|  |  |
| --- | --- |
| **Antioksidan** | **EC50 (µg/ml)** |
| Vitamin C (standart) | 1,697 |
| Trolox (standart) | 1,729 |
| Ellagik asit | 1,881 |
| Kuarsetin | 1,722 |
| Kurkumin | 2,800 |
| Resveratrol | 3,970 |
| Silimarin | 7,812 |
| Vitamin E | 3,123 |
|  |  |

Çalışmada standart antioksidan olarak vitamin C ve trolox kullanılmıştır. EC50 değerleri sırası ile 1,697 µg/ml ve 1,729 µg/ml bulunmuştur. Antioksidanların DPPH radikalini süpürme aktivitesi sıralaması ise kuarsetin (1,722 µg/ml) > ellagik asit (1,881 µg/ml) > kurkumin (2,800 µg/ml) > vitamin E (3,123 µg/ml) > resveratrol (3,970 µg/ml) > silmarin (7,812 µg/ml) olarak belirlenmiştir.

# 5. TARTIŞMA

Vücudu koruma görevinde olan antioksidanların serbest radikallere elektronlarını vererek onların toksik etkilerini ortadan kaldırmaları ve kendilerinin serbest radikale dönüşmemesi en önemli özellikleridir (Prior ve Cao, 2000). Antioksidanlar bu etkilerinden halen çeşitli klinik ve laboratuvar çalışmalarında önemini korumaktadır. Bu kapsamda bileşiklerin içerdiği antioksidan miktarının belirlenmesi amacıyla çok sayıda antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri de bu çalışmada kullanılan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan kapasite tayin yöntemidir. DPPH yöntemi hızlı, basit, doğru, kullanışlı ve ucuz bir yöntemdir (Molyneux, 2004). DPPH yöntemi daha çok fenolik bitki ekstraktlarından elde edilen numunelerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılmaktadır. Bu çalışmada DPPH antioksidan kapasite tayin yöntemi ile deneysel çalışmalarda sık kullanılan bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Nitekim bitkilerin ekstraktsiyonu ile elde edilen doğal antioksidanların antioksidan kapasitesi farklı yöntemlerle ölçülmesine rağmen, sentetik olarak üretici firmalar tarafından piyasaya sunulan ve özellikle deneysel çalışmalarda kullanılan sentetik antioksidanların antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması ile ilgili çalışmaya rastlanamamıştır.

Fenolik yapıdaki antioksidan maddelerin aktivitelerini incelemek adına kullanılan ilk azot radikallerinden biridir (Frankel ve Meyer, 2000). Antioksidan özelliği araştırılan maddenin DPPH ile reaksiyonu kimyasal yapısındaki hidroksil grubundaki hidrojen atomuyla elektronun yer değiştirmesine bağlı olarak değişmektedir. Tez kapsamında kullanılan sentetik antioksidanlar flavonoid yapıda fenolik bileşikler olup, yapılarında hidroksil grubu bulunmaktadır. Ancak selenyum, folik asit, borik asit ve metiyonin gibi antioksidanların ise hidrojen atomu verebileceği hidroksil grubuna sahip olmamaları veya yetersiz miktarda sahip olmaları nedeniyle DPPH radikalini indirgeyemediklerinden bu çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmada standart olarak kullanılan olan vitamin C ve troloxun EC50 değerleri sırası ile 1,697 µg/ml ve 1,729 µg/ml olarak belirlenmiştir. Standart ile karşılaştırıldığında en düşük antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın EC50 değeri 7,812 µg/ml olan silimarin, en yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın ise EC50 değeri 1,722 µg/ml olan kuarsetin olduğu belirlenmiştir.

Mehta ve ark (2017)’nın yapmış olduğu *in vitro* çalışmada kuersetin, askorbik asit, kafein, ellagik asit, gallik asit, rosiglitazon, metformin ve glimepiridinin diyabetle ilişkili nörolojik komplikasyonların gelişimine yol açan yolaklara müdahale etmede daha etkili olduğunu bildirmişler ve antioksidan etkilerini karşılaştırmak için DPPH yöntemini kullanmışlardır. 6,25 µM konsatrasyonda askorbik asit, kuarsetin ve ellagik asit için % inhibisyon değerleri sırasıyla % 94.09, % 92.00 ve % 88.71 olarak belirlenmiştir. EC50 değerleri ise ellagik asit için 0,03 µM, askorbik asit için 0,02 µM ve kuarsetin için 0,006 µM bulunmuştur. Çalışmamızda 6,25 µg/ml’lik konsantrasyonlarda askorbik asit, kuarsetin ve ellagik asitin inhibisyon değerleri sırası ile % 94.30, % 91.93 ve % 83.63, EC50 değerleri ise sırası ile 1,697 µg/ml, 2,800 µg/ml ve 1,881 µg/ml bulunmuştur. EC50 değerlerinin sıralamasındaki bu tutarsızlığın nedeni, DPPH solüsyonlarının hazırlanmasında metanol kullanılmasına rağmen molarite farklılıklarına bağlı olabilir. Çalışmamızda 0,1 mM DPPH kullanılmış iken, Mehta ve ark (2017)’ı ise 0,4 mM DPPH kullanmışlardır.

Somparn ve ark (2007) kurkumin ile demetoksi ve hidrojen türevlerinin karşılaştırmalı olarak antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. EC50 değerleri standart olarak kullanılan troloxun 31,1 µM ve kurkuminin ise 35.1 µM olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olup, troloxun kurkuminden daha yüksek DPPH radikalini süpürme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Jadhav ve ark (2009) kırmızı şarap ve silimarinin antioksidan potansiyelini DPPH yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Resveratrol içeren kırmızı şarap ve silimarin, standart olarak kullanılan vitamin C ile karşılaştırılmıştır. 100 µg/ml’lik konsantrasyonlarda vitamin C % 94.45, resveratrol % 87.69 ve silimarin % 88.84 inhibisyon göstermiştir. Çalışmada resveratrol ve silimarinin EC50 değerleri sırasıyla 30 µg/ml ve 22 µg/ml’dir. Çalışmamızda 100 µg/ml’lik konsantrasyonlarda resveratrolün ve silimarinin inhibisyon değerleri sırası ile % 91.34 ve % 89.63, EC50 değerleri ise sırası ile 3,970 µg/ml ve 7,812 µg/ml bulunmuştur. EC50 değerleri açısından kaynaklanan bu farklılık, Jadhav ve ark (2009)’nın kırmızı şarapta bulunan resveratrolü kullanmalarına, silimarini farklı üretici firmadan temin etmelerine bağlı saflığına veya laboratuvar şartlarına (sıcaklık, ışık vb.) bağlı olabilir. Bondet ve ark (1997) DPPH radikal süpürücü aktivite tayininde antioksidan etkinliğin ortam sıcaklığında ölçülmesi gerektiğini ve bu nedenle test edilen moleküllerin termal bozunma riskinin göz önünde bulundurulması gerektiğini bildirmişlerdir.

Calil ve ark (2012) resveratrol anologlarının antioksidan kapasitesini standart olarak resveratrol kullanarak ölçmüşlerdir. Resveratrolün EC50 değeri 8,5 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu değer bizim bulduğumuz sonuçtan biraz daha yüksek bir değerdir. Bunun nedeni DPPH yönteminde kullanılan DPPH veya araştırılan antioksidanların konsatrasyonlarındaki farklılıklara, kullanılan çözücülere, DPPH’ın ya da antioksidanların ışığa veya havaya maruziyetine bağlı olabilir. Bu durumda farklı sonuçlar elde edilebilir (Mishra ve ark, 2012). Kaldı ki Calil ve ark (2012) çalışmalarında DPPH solüsyonunu 0,05 mM olarak hazırlamışlar ve etanolde çözdürmüşlerdir. Çalışmamızda ise DPPH 0,1 mM konsantrasyonda ve metanolde hazırlanmıştır Bu durumun sonuçlar arasındaki farklılığı açıkladığını söyleyebiliriz.

Antioksidanların DPPH radikalini süpürme aktivitesi ile ilgili yapılan araştırmaların çoğunluğunun bitki veya gıdalardan elde edilen ekstraktlarla yapılmış olması ya da bu araştırmalarda doğal yollarla elde edilen antioksidanlarla sentetik antioksidanların karşılaştırılması dolaysıyla sadece sentetik antioksidanların kullanıldığı araştırmaların yetersiz olması bu çalışmanın sınırlılıkları içerisinde yer almaktadır.

# 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Oksidatif strese karşı güncel tıp biliminde büyük ölçüde sınama yanılma yöntemiyle bazı tedaviler önerilmekte ise de aslında tedavi yaklaşımlarının moleküler tıbba dayandırılması gittikçe önem kazanmaktadır. Bu da gerek hastaların ve gerekse sağlıklı insanların diyetlerinin koruyucu ve tedavi edici hekimlik bağlamında doğal ve yapay antioksidanlarla takviye edilmesini gerekli kılmaktadır. Doğal antioksidanların en önemli kaynağı bitkiler olup özellikle insan beslenmesinde bitkisel kaynaklı besinlerin kullanılması özendirilmekte ve giderek artmaktadır. Moleküler düzeyde çok büyük çeşitlilik gösteren antioksidan maddelerin bitkilerdeki miktarları ve dağılımları araştırma konusudur. Bu araştırmalar yüksek antioksidan aktivite gösteren molekülleri içeren bitkisel kaynaklı besinlerin önerilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle de antioksidan aktiviteyi ölçmek üzere kullanılan çeşitli tayin yöntemlerinin geliştirilmesi ve karşılaştırılması son zamanlarda en önemli araştırma konularından biridir.

Tez kapsamında deneysel çalışmalarda daha sık kullanılan bazı sentetik antioksidanların 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan kapasite tayin yöntemi ile antioksidan kapasiteleri arasındaki farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada çeşitli firmalar tarafından ticari olarak üretilen bazı sentetik antioksidanlar kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler de ticari sentetik antioksidanların DPPH radikalini süpürme kapasitesinin değişkenlik gösterdiğini, kuarsetinin 1,722 µg/ml EC50 değeri ile en yüksek, silimarinin ise 7,812 µg/ml EC50 değeri ile en düşük DPPH radikalini süpürme aktivitesine sahip olduğu göstermektedir.

Hayvan deneyleri farmakodinami ve farmakoterapi açısından önemli bir yere sahiptir. Elde edilen sonuçlar ışığında hayvan deneyi çalışmalarında tercih edilen ve sık kullanılan sentetik antioksidanların seçiminde antioksidan kapasitelerinin de göz önünde bulundurulması ve araştırılması yapılan maddeye göre antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin farklı olabileceği ve buna göre seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

# KAYNAKLAR

**Agarwal M, Parameswari RP, Vasanthi HR, Das DK.** Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules* 2012, 17, 4755-4769.

**Ak T, Gülçin İ.** Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction* 2008, 174, 27-37.

**Akagün G.** Alabaş (*Brassica oleracea var. gongylodes*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Edirne 2009.

**Akkuş İ.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Ed, Konya, 1995, Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım.

**Ames BN.** Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology Letters* 1998, 102–103. **An D, Zhang Q, Wub S, Wei J, Yang J, Dong F, Yan X, Guo C.** Changes of metabolic profiles in urine after oral administration of quercetin in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010,48, 1521-1527.

**Antmen E.** Beta talasemide oksidatif stres, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana 2005.

**Antwerpen PV, Boudjeltia KZ, Babar S, Legssyer I, Moreau P, Moguilevsky N, Vanhaeverbeek M, Ducobu J, Ne`ve J.** Thiol-containing molecules interact with the myeloperoxidase/H2O2/chloride system to inhibit LDL oxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 337 (1), 82-88.

**Ardağ A.** Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Aydın 2008.

**Arnao MB.** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Scıence & Technology* 2000, 11, 419-421.

**Blois MS.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199-1200.

**Bondet V, Brand-Williams W, Berset C.** Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 1997, 30, 609-615.

**Bosisio E, Benelli C, Pirola O.** Effect of flavanoligans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacological Research* 1992, 25, 147-154.

**Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Scıence and Technology-Lebensmıttel-Wıssenschaft & Technologıe* 1995, 28: 25-30.

**Burnaz N.** On-line HPLC-FRAP antioksidan aktivite tayin yönteminin geliştirilmesi ve bazı doğal ürünlere uygulanması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 2013.

**Büyüktuncel E.** Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2013, 17, 93-103.

**Calil NO, Carvalho GSG, ,Franco DCZ, Silva AD, Raposo NDB.** Antioxidant activity of resveratrol analogs. *Letters in Drug Design & Discovery* 2012, 9, 8-11.

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

**Chapman MS.** Vitamin A: History, current uses, and controversies. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 2012, 31, 11-16.

**Cheeseman KH, Slater TF.** An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993, 49(3), 481-93.

**Clapier VR.** Potantiating exercise traning with resveratrol. *The Journal of Physiology* 2012, 590(14), 3215-3216.

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

**Delibaş N, Özcankaya R.** Serbest radikaller. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1995, 2(3), 11-17.

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

**Elliot JG.** Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology* 1999, 53(2), 46-48.

**Engin MS.** Taflan (*Laurocerasus officinalis Roem*.) bitkisinin meyve çekirdek ve Yapraklarının mevsim değişikliğine göre göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpasa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat 2007.

**Fang YZ, Yang S, Wu G.** Free radicals, antioxidants, and nutrition**.** *Nutrition* 2002,18, 872-879.

**Frankel EN, Meyer AS.** The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, 1925-1941.

**Freeman BA, Crapo JD.** Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Laboratory *Investigation - Nature* 1982, 47, 412-26.

**Fukumoto LR, Mazza G.** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agrıcultural and Food Chemıstry* 2000, 48, 3597-3604.

**Garewal HS.** Antioxidants and disease prevention. *CRC Press LLC*, 1997, 3-19.

**Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK.** Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *The American Journal Clinical Nutrition* 1991, 53, 326-334.

**Gilbert DL.** Fifty years of radical ideas. *Annals New York Academy of Scıences* 2000, 899, 1-14.

**Gülçin İ.** Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2010, 11, 1, 210-218.

**Halliwell B, Gutteridge JMC.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 1984, 219, 1-14.

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

**Huang D, Ou B, Prior RL.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agrıcultural and Food Chemıstry* 2005, 53, 1841-1856.

**Iino T, Kiso Y, Nakahara K, Miki W, Ogawa Y, Kato S, Takeuchi K.** Less damaging effect of whisky in rat stomachs incomparison with pure ethanol: Role of ellagik asit, the nonalcoholic ingredient. *Digestion* 2001,64 (4), 214-221.

**Jadhav GB, Upasani CD, Pingale AP** Antioxidant potential of red wine and silymarin: in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy Research* 2009, 2(4), 636-639.

**Kavas ÖG.** Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989, 9(1), 1-8.

**Kılıç İ, Yeşiloğlu Y, Bayrak Y.** Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2014, 130, 447-452.

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

**Köksal E, Gülçin İ, Beyza S, Sarikaya Ö, Bursal E.** In vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2009, 24(2), 395–405.

**Liu T, Stern A, Roberts LJ.** The isoprostanes: Novel prostanglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of Biomedical Science* 1999, 6, 226–35.

**Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP.** The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine* 1997, 22(5), 885-888.

**Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010, 4(8), 118–126.

**Lovell MA, Ehmann WD, Buffer BM, Markesberry WR.** Elevated thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzemers Disease. *Neurology* 1995, 45, 1594–1601.

**Lykkesfeldt J, Svendsen O.** Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 2007, 173, 502-511.

**Maddipati KR, Marnett LJ.** Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biomedical Science* 1987, 262, 17398-403.

**Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC.** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 2008, 613,1-19.

**Mandal S, Yadav S, Nema, RK.** Antioxidants: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2009, 1(1), 102-104.

**Mansouri A, Muller FL, Liu Y, Ng R, Faulkner J, Hamilton M, Richardson A, Huang T-T, Epstein CJ, Remmen HV.** Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006; 127(3), 298-306.

**Mates JM, Perez-Gomez J, Castro IN.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 1999, 32(8), 595-603.

**Mehta V, Verma P, Sharma N, Sharma A, Thakur A, Malairaman U.** Quercetin, ascorbic acid, caffeine and ellagic acid are more efficient than rosiglitazone, metformin and glimepiride in interfering with pathways leading to the development of neurological complications associated with diabetes: A comparative in-vitro study. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 2017, 55, 115–121.

**Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK.** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results*. Food Chemistry* 2012, 130, 1036–1043.

**Molyneux P.** The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Technology* 2004, 26 (2), 211-219.

**Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** Harper’ın Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi 1996, İstanbul.

**Nappi AJ, Vass E.** Hydroxyl radical formation via iron-mediated Fenton Chemistry is inhibited by methylated catechols. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1425, 159–67.

**Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J.** Natural Antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* 2010, 15, 6905-6930.

**Niki E.** Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 1987, 44(2-4), 227-253.

**Onat T, Emerk K, Sözmen E.Y.** İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 2002, Ankara.

**Özcelik B, Lee JH, Min DB.** Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal Of Food Scıence* 2003, 68, 487-490.

**Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 2007, 87, 315-424.

**Padma VV, Selvi PK, Sravani S.** Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. *Molecular Biology Reports* 2014, 41, 4223-4232.

**Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wu HY, Wei YH, Jou MJ.** Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, 1762(2), 241-255.

**Perez-Jimenez J, Arranz S, Tabernero M, Diaz-Rubio ME, Serrano J, Goni I, Saura- Prior RL, Cao GH.** Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *Journal of AOAC International* 2000, 83(4), 950-956.

**Prior RL, Wu X, Schaich K.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agrıcultural and Food Chemıstry* 2005, 53, 4290-4302.

**Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA.** Potential problems of ascorbate and iron supplementation: prooxidant effect in vivo? *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2000, 277, 535-540.

**Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU.** Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2012, 3, 997-1019.

**Reddy AC, Lokesh BR.** Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1994, 137, 1–8.

**Saldanha FJ, Leal OV, Stenvinkel P.** Resveratrol: why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, Article ID 963217, 6.

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

**Somparn P, Phısalaphong C, S Nakornchaı, S Unchern, Np Morales.** Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2007, 30(1), 74-78.

**Tamer L, Polat G, Eskandari G** Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2000, 1, 52-58.

**Valenzuella A, Garride A.** Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural silibinin. *Biological Research* 1994, 27, 105-112.

**Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-Biological Interactions* 2006, 160, 1–40.

WEB\_1. (2011). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. [http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf (09.02.2017).](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf%20%2809.02.2017%29.%20)

**Willcox JK, Ash SL, Catignani GL.** Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2004, 44, 275–295.

**Yapar SB.** Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne 2006.

**Yavaşer R.** Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Aydın 2011.

# ÖZGEÇMİŞ

|  |  |
| --- | --- |
| **Soyadı, Adı** | : BARDAKÇI Özge |
| **Uyruk** . | : T.C. |
| **Doğum yeri ve tarihi**  | : Malatya / 08.06.1990 |
| **E-mail**  | : bardakci24@gmail.com |
| **Yabancı Dil**  | : İngilizce (YÖKDİL 58,75) |

|  |  |
| --- | --- |
| **EĞİTİM** |  |
| **Derece**  | **Kurum**  | **Mezuniyet tarihi** |
| Lisans | Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi | 21.07.2014 |