



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*ONOBRYCHIS ARGYREA* SUBSP.  
*ISAURICA*'NIN (FABACEAE) ANTIÖKSİDAN  
AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fırat KARADAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Mart-2018  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Fırat KARADAĞ tarafından hazırlanan “*Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*’nın (Fabaceae) antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi” adlı tez çalışması 16/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Doç. Dr. Gökhan ZENGİN

#### Danışman

Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

#### Üye

Prof. Dr. Esra MARTİN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARALI  
FBE Müdürü

Bu tez alışması NEÜ BAP tarafından 161310007 nolu proje ile desteklenmiştir.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Fırat KARADAĞ

16.03.2018

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ***ONOBRYCHIS ARGYREA* SUBSP. *ISAUERICA*'NİN (FABACEAE) ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Fırat KARADAĞ**

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER**

**2018, 67 Sayfa**

**Jüri**

**Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER**

**Prof. Dr. Esra MARTİN**

**Doç. Dr. Gökhan ZENGİN**

Bu çalışmada, *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bitkisel materyallerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde sadece bir metot ile çalışılması yeterli olmadığı için birden fazla sayıda metot kullanılmaktadır. Bu çalışmada; total antioksidan kapasite (fosfomolibdat), DPPH (2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil) metodu, ABTS metodu, demir ve bakır indirgeme gücü metotları (FRAP ve CUPRAC) uygulanmıştır. Ayrıca bu metotlara ilave olarak özütlerin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri de çalışılmıştır. Uygulan tüm metotlarda *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın metanol, etil asetat ve su özütleri kullanılmıştır. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'da toplam fenolik ve flavonoid içerik ile toplam antioksidan kapasite genel olarak metanol özütünde, etil asetat ve su özütlerine göre daha yüksek tespit edilmiştir. DPPH, FRAP ve CUPRAC yönteminde de en yüksek sonuçlar metanol özütlerinde elde edilmiştir. ABTS radikali süpürme ve metal şelatlama kapasitelerinin çalışıldığı metotlarda ise en yüksek aktiviteler su özütlerinde tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında; farklı tipteki çözücülerin kullanılan metotların türüne göre sonucu etkilediği görülmektedir. Bu çalışma bundan sonraki yapılacak çalışmalarda çözücü seçiminde yardımcı olabilecek niteliktedir. Ayrıca çalışma sonuçları değerlendirildiğinde; *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilceğini düşünülebilir. Tüm bunlar dikkate alındığında bu çalışma bu tür üzerine yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Fabaceae, Fenolikler, *Onobrychis argyrea*

## ABSTRACT

## MS THESIS

### EVOLUTION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ONOBRYCHIS ARGYREA* SUBSP. *ISAUERICA* (FABACEAE)

Fırat KARADAĞ

#### THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Gokalp Ozmen GULER

2018, 67 Pages

Jury

Prof. Dr. Gokalp Ozmen GULER

Prof. Dr. Esra MARTIN

Doç. Dr. Gokhan ZENGIN

In this study, it was aimed to determine the antioxidant capacity of *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*. In determining the antioxidant capacity of plant materials, it is not sufficient to study only one method, so more than one method is used. In this study; total antioxidant capacity (fosfomolibdat), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, ABTS method, iron and copper reduction potency methods (FRAP and CUPRAC) were applied. In addition to these methods, the total phenolic and flavonoid contents of the extracts were also studied. Methanol, ethyl acetate and water extracts of *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* were used in all of the methods applied. Total phenolic and flavonoid content and total antioxidant capacity of *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* were generally higher in methanol extract than in ethyl acetate and water extracts. Even in DPPH, FRAP and CUPRAC methods, the highest results were obtained in methanol extracts. The ABTS radical scavenging and metal chelating capacities were the highest activities detected in water extracts. According to the study results; it is seen that the methods used for different types of solvents are influenced by the result. This work will be able to assist in the selection of solvents in future work. In addition, when the study results are evaluated; *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* may be used as a natural antioxidant source. When all this is taken into account, this work will shed light on other work on this species.

**Keywords:** Antioxidant, Fabaceae, *Onobrychis argyrea*, Phenolics

## ÖNSÖZ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakóltesi Fizyoloji-Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Selçuk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji-Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yürütölmüş olan bu tez çalışmasında, Türkiye florasındaki bir tür olan *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın antioksidan kapasitesi, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri belirlenmiştir.

Bu tez konusunu bana veren ve çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, yol gösteren, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Analizlerin gerçekleştirilmesi ve yorumlanmasında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e, Dr. Şengül UYSAL'a ve doktora öğrencisi Ramazan CEYLAN'a özellikle çok teşekkür ederim. Yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e çok teşekkür ederim. Ayrıca 161310007 nolu proje ile destek olan NEÜ BAP'a da teşekkürlerimi sunarım.

Fırat KARADAĞ  
KONYA-2018

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>5</b>
2.1. Serbest Radikaller .....	5
2.2. Reaktif Oksijen Türleri .....	5
2.2.1. Singlet (Tekli) oksijen .....	6
2.2.2. Süperoksit radikali .....	6
2.2.3. Hidrojen peroksit .....	7
2.2.4. Hidroksil radikali .....	7
2.2.5. Nitrik oksit radikali .....	7
2.3. Serbest Radikal Kaynakları .....	8
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri .....	8
2.4.1. Serbest radikallerin yararlı etkileri .....	8
2.4.2. Serbest radikallerin zararlı etkileri.....	8
2.5. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemleri .....	9
2.6. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	11
2.6.1. Endojen (doğal) antioksidanlar .....	11
2.6.2. Eksojen antioksidanlar .....	17
2.6.3. Sentetik antioksidanlar.....	18
2.7. Antioksidan Etki Tipleri .....	19
2.8. Oksidatif Stres.....	20
2.9. Polifenolik Bileşikler .....	21
2.9.1. Flavonoidler .....	22
2.9.2. Fenolik asitler .....	23
2.9.3. Fenolik polimerler (Tanenler).....	23
2.10. Fabaceae Familyası İle İlgili Yapılan Bazı Antioksidan Çalışmalar .....	24
2.11. Fabaceae Familyası ve <i>Onobrychis</i> Cinsi .....	25
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> Taksonu .....	27

3.2. Bitkisel Ekstraktların Hazırlanması .....	27
3.3. Antioksidan Kapasite Tayin Testleri .....	27
3.3.1. Toplam antioksidan bileşenlerin belirlenmesi .....	27
3.3.2. Serbest radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi .....	28
3.3.3. İndirgeme gücünün belirlenmesine yönelik testler .....	29
3.3.4. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi.....	29
3.3.5. Metal şelatlama aktivitesi .....	30
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
4.1. Antioksidan Kapasite Metotlarına Ait Sonuçlar .....	31
4.1.1. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği .....	31
4.1.2. Toplam antioksidan kapasite (Fosfomolibdat testi).....	34
4.1.3. ABTS ve DPPH giderme etkinliği.....	35
4.1.4. Demir ve bakır indirgeme gücü .....	37
4.1.5. Metal şelatlama aktivitesi .....	40
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>43</b>
5.1. Sonuçlar .....	43
5.2. Öneriler .....	44
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>56</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin toplam fenolik içeriği.....	32
Şekil 2. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin toplam flavonoid içeriği.....	33
Şekil 3. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin toplam antioksidan kapasitesi.....	34
Şekil 4. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin DPPH aktivitesi.....	36
Şekil 5. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin ABTS aktivitesi.....	37
Şekil 6. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin CUPRAC aktivitesi.....	39
Şekil 7. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin FRAP aktivitesi.....	40
Şekil 8. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin metal şelatlama aktivitesi.....	41



## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> 'nın toplam fenolik, flavonoid içerikleri ve toplam antioksidan kapasiteleri.....	31
Tablo 2. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin DPPH ve ABTS radikali süpürme etkinliği.....	35
Tablo 3. <i>Onobrychis argyrea</i> subsp. <i>isaurica</i> özütlerinin FRAP, CUPRAC ve metal şelatlama aktiviteleri.....	38



## KISALTMALAR

AA: Askorbik Asit  
ABTS: 2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonik Asit  
Asc•-: Askorbat Radikali  
BHA: Bütillenmiş Hidroksianisol  
BHT: Bütillenmiş Hidroksitoluen  
CAT: Katalaz  
CUPRAC: Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi  
DHA: Dehidroaskorbik Asit  
DNA: Deoksiribonükleik Asit  
DPPH: 1,1-diphenyl-2picrylhydrazil  
EC<sub>50</sub>: Ortalama Etkin Doz  
EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit  
EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi  
FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi  
FRAP: Demir(III) İyon Azaltıcı Antioksidan Parametre  
G6PD: Glukoz-6-fosfat Dehidrojenaz  
GAE: Gallik asit Eşdeğeri  
GPx - GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz  
GR: Glutasyon Redüktaz  
GSH: Glutasyon  
GSSG: Yükseltgenmiş Glutasyon  
GST: Glutasyon-S-Transferaz  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit  
IC<sub>50</sub>: Median Inhibition Concentration  
LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler  
MDA: Malondialdehit  
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat  
NDGA: Nordihidroguayeretik Asit  
NO: Nitrik Oksit  
NOS: Nitrik Oksit Sentaz  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Süperoksit Radikali  
OG: Oktil Gallat  
OH•: Hidroksil Radikali  
PG: Propil Gallat  
PPH: Polifenolik Antioksidanlar  
RE: Rutin Eşdeğeri  
RNS: Reaktif Nitrojen Türü  
ROO•: Peroksi Radikali  
ROOH: Hidroperoksit  
ROS: Reaktif Oksijen Türü  
ROT: Reaktif Oksijen Türü  
SC<sub>50</sub>: Ortalama Süspansiyon Konsantrasyonu  
SH: Sülfidril  
SOD: Süperoksit Dismutaz  
TAC: Toplam Antioksidan Kapasitesi  
TBHQ: Tersiyer Bütül Hidrokinon  
TE: Troloks Eşdeğeri  
TPTZ: Tripiridiltriazin

## 1. GİRİŞ

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir ve oldukça reaktiftirler. Reaktif radikaller bir dizi reaksiyon sonucunda aktif radikallere dönüşerek; doku hasarı, organ fonksiyonlarının bozulması ve hasara bağlı hücre ölümlerine sebep olabilmektedir (Eryılmaz, 2001).

Serbest radikallerin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları sınırlandırmak için, biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (Yıldırım, 2003). Bunlar arasında; serbest radikal oluşumunun engellenmesi, oksidan maddelerin detoksifiye edilmesi, oluşan reaktif maddelerin dokulardan uzaklaştırılması ve oluşan hasarların giderilmesi sayılabilir (Akkuş, 1995; Çavdar ve ark., 1997; Yıldırım, 2003; Beşkaya, 2004).

Metabolizmada endojen kaynaklı birçok reaktif oksijen türü ve serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller aynı zamanda hücreler arası iletişim görevi de yaparlar. Fakat bunların aşırı miktarda oluşması oksidatif stres, erken yaşlanma, hücre fonksiyonlarının ve biyokimyasal moleküllerin yapılarının bozulması ile beraber pek çok patolojik rahatsızlıkların oluşmasına sebep olur (Nordberg ve Arner, 2001).

Son zamanlarda reaktif oksijen türleri'nin (ROS) kanser ve arteroskleroz (damar sertliği) gibi hastalıkları tetiklediği de kabul edilmiştir (Cuendet ve ark., 1997). ROS hücrelerde birçok zarar meydana getirebilmektedir, bu zararlar genellikle hücre genomunu etkilemektedir. Vücutta oksidatif hasara sebep olan serbest radikaller; katabolik reaksiyonlar, sağlıksız beslenme, zararlı alışkanlıklar ve çevre kirliliğinden dolayı oluşmakta ve artış göstermektedir. Serbest radikaller çeşitli hastalıklara ve yaşlanmaya sebebiyet vermektedir. Yaşlanan ve hasta durumda olan hücreler çok daha fazla miktarda serbest radikal üretebilmektedir (McCord, 1993). Serbest radikallerin bu olumsuz etkilerinden korunmak için antioksidanlara gereksinim vardır. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek organizmayı birçok hastalıktan korumaktadır (Gökpinar ve ark., 2006).

Organizmalarda bulunan antioksidan savunma mekanizmaları ROS türlerinin arttığı durumlarda devreye girerek antioksidan maddeler üretir ve organizmayı serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur (Rice-Evans ve ark., 1997). Antioksidan olan bu maddeler bitkiler tarafından sentezlenir. Bitkiler tarafından sentezlenen bu metabolitlerin büyük bir kısmı fenolik bileşiklerdir ve organizma tarafından diyetle

alındığında insan vücudunda da antioksidan özellikler gösterebilirler (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Bu nedenle son yıllarda insanlar tarafından besin kaynaklı doğal antioksidanların alınması özendirilmektedir. Öte yandan antioksidan bileşikleri bolca içeren bitki ekstraktlarının (Karagözler ve ark., 2008) besin endüstrisinde koruyucu madde olarak kullanılması da son yıllarda oldukça sık rastlanan bir uygulamadır.

Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki sınıf halinde bulunurlar. Bitkilerde bulunan fenoller, azotlu bileşikler, vitamin C ve karotenoidler doğal antioksidanlardandır ve vücutta serbest radikallerle savaşırlar. Sentetik antioksidanların kullanımı konusunda ise bazı şüpheler bulunmaktadır. Bu yüzden araştırmalar doğal antioksidan kaynağı olabilecek bitkilere yönlendirilmiştir (Velioğlu ve ark., 1998).

Serbest radikaller yüksek konsantrasyonlarda nükleik asitler, lipitler ve proteinlerde hasar meydana gelmesine yol açarlar (Valko ve ark., 2006). Örneğin, hidroksil radikali DNA ile etkileşmekte ve pürin, pirimidin bazlarının hasarı ile deoksiriboz iskelette zararlar meydana getirmektedir. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu durumda radikallerin aşırı üretimi kanser, kardiovasküler hastalıklar, yaşlanma gibi birçok kronik ve dejeneratif hastalığın gelişimine katkıda bulunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Özellikle makro moleküller içerisinde, bünyesinde aşırı doymamış yağ asitlerini içeren lipitler serbest radikallere karşı en hassas olan molekül grubudur (Siems ve ark., 1995). Lipit peroksidasyonun son ürünü olarak malondialdehit (MDA) meydana gelmektedir. MDA memeli hücrelerinde mutajenik ve karsinojenik etki gösterebilmektedir.

Serbest radikallerin meydana getirdiği bu zararlı etkilerin ortadan kaldırılması için organizmada bir savunma sistemi gelişmiştir (Cadenas, 1997). Enzimlerin oluşturduğu bu sistemi süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) meydana getirmektedir. Normal koşullarda bu enzimler ve serbest radikal üretimi arasındaki denge sağlıklı bir yaşamın sürdürülmesi açısından çok büyük öneme sahiptir. Ancak dış faktörlerin, örneğin; UV ışınları, çevre kirliliği ve tütün kullanımı gibi faktörler ile radikal üretimi antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aşarsa bu durumda diyetle antioksidanların alımı büyük önem kazanmaktadır (Valko ve ark., 2007).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'nin canlı organizmalarda lipit, protein, enzim ve nükleik asitlere hasar vererek; iltihap, kanser, damar tıkanıklığı, diyabet, karaciğer zedelenmesi, Alzheimer, Parkinson ve koroner

kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın oluşumuna neden olan hücre veya doku zedelenmesine sebep olur (Duan ve ark., 2006).

Günümüzde artan çevresel kirlilik ve sağlıksız beslenme gibi nedenlerden dolayı kanser ve diyabet türü hastalıklar önemli derecede artmıştır. Bu hastalıkları önleme için antioksidanların kullanılması fikri dikkat çekmektedir. Yapılan birçok çalışmada antioksidanların insanlarda görülen yaşlılık ve kronik hastalıklara karşı önleyici ve iyileştirici etkileri ortaya konulmuştur (Ratnam ve ark., 2006). Thomas ve ark. (2010), antioksidanların insan vücudunu oksidatif hasardan koruduğunu ve birçok hastalıkta önleyici olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte insanlarda sentezlenen antioksidan miktarı sınırlıdır ve biyolojik sistemin antioksidan kapasitesini aştığı durumlarda oksidatif stres denilen durum ortaya çıkmaktadır. Bu sebeplerden dolayı beslenme yoluyla antioksidanların alınması birçok hastalığın önlenmesinde önem arz etmektedir. Tüm bunlar dikkate alındığında bitkilerde bulunan moleküllerin antioksidan özelliklerinin araştırılması önemli hale gelmiştir (Albayrak ve ark., 2010).

Bu nedenlerle, ROS ve RNS türlerinin yol açtığı oksidatif stresten insan vücudunu korumak için serbest radikal süpürücü doğal kaynaklı antioksidanlara ilgi giderek artmaktadır (Gonçalves ve ark., 2005).

Fabaceae familyası içinde bulunan bitkiler hayvan ve insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Fabaceae familyası bitkileri, hayvanların beslenme ve sağlığının korunmasında da önemli bir konumda bulunmakta (Foo ve ark., 2000), insanlarda ise bazı türlerin antidiyabetik, antikanserojen, antioksidan, antiinflamatuvar özellik gösterdiği, kardiovasküler hastalıklarına karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir (Baytop, 1988).

*Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* Hedge & Hub.- Mor. (korunga), Angiospermae (kapalı tohumlular)'nın Dicoytedonae (iki çenekliler) sınıfı, Rosales takımının Leguminosae (Baklagiller) familyasının Papilionoidae alt familyası içinde yer almaktadır (Yüksek ve ark., 2002).

Dünyada 160 civarında *Onobrychis* (korunga) türünün olduğu bilinmektedir. Geniş bir adaptasyon kabiliyetine sahip olan yabani korunga türleri Baltık Denizi'nden, Akdeniz, Ön Asya ve Sibirya'ya kadar uzanan çok geniş bir alana yayılmıştır. Özellikle Anadolu-İran-Kafkasya üçgeninde yoğunlaşmış ve çeşitlenmiştir. Bu bölgelerden Türkiye'de 52 türden 27'si (%51.9), İran'da 53 türden 32'si (%60.4) ve Kafkasya da 39 türden 21'i (%53.4) endemiktir. Bu veriler doğrultusunda Türkiye'nin bu cins bakımından önemli gen merkezlerinden biri olduğu ortaya çıkmaktadır (Aktoklu, 1995).

Yapılması planlanan bu tez çalışmasının amacı; ülkemizde yayılış gösteren *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın antioksidan kapasitesinin belirlenmesidir. Yapılan literatür taramasına göre, bu türün antioksidan kapasitesi ile ilgili yapılmış olan bir çalışmaya rastlanılmaması bu tezin önemini bir kat daha artırmıştır. Günümüzde beslenme, sağlık, kozmetik ve ilaç hammaddesi alanında yeni doğal hammadde kaynaklarının tespitinin çok önemli olduğu düşünüldüğünde, *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın doğal antioksidanların bir kaynağı olarak kullanılıp kullanılmayacağı bu tezin ana amaçlarından biridir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikalleri incelediğimizde atomların ya da moleküllerin orbitallerinde ortaklanmamış elektrona sahip olduğunu görürüz. Bu ortaklanmamış elektron(lar) serbest radikalın oldukça reaktif ve kararsız durumda olmasından sorumludur. Ortaklanmamış elektron, molekülün formülünde nokta şeklindeki bir simge ile (•) gösterilir (Gruhlke ve Slusarenko, 2012). Serbest radikaller küçük moleküllerdir, düşük aktivasyon enerjisine sahiptirler ve kısa ömürlüdürler. Boyutlarının küçük olması hücre membranlarından kolaylıkla geçmelerine olanak sağlar (Jensen, 2003). Organizmada meydana gelen serbest radikaller ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulduğu durumlarda oksidatif stres oluşur. Neticede bu dengesizlik hücrenin DNA, karbonhidrat, membran lipitleri ve protein yapıları gibi en önemli kısımlarında oksidatif hasarlara neden olabilir. Bu bakımdan oksidatif stresin oluşum sebeplerinin ve sonuçlarının insan sağlığı üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkiler önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Serbest radikaller organizmada üç farklı mekanizma sonucu oluşurlar: bunlardan ilki kovalent bağ taşıyan molekülün homolitik yıkımı ile oluşan serbest radikallerdir. İkinci olarak radikal olmayan molekülden tek elektronun ayrılması yahut bir molekülün heterolitik yolla parçalanmasından sonra kovalent bağı meydana getiren her iki elektronun atomlardan sadece birinde kalması ile oluşur. Son olarak serbest radikaller, bir moleküle fazladan bir elektron eklenmesiyle oluşmaktadır.

Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabilmektedirler. Organizmalarda en çok elektron aktarımları ile oluşurlar. Meydana gelen bu serbest radikaller arasında en önemlileri oksijen kaynaklı serbest radikallerdir.

### 2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen çeşitleri endojen ve eksojen kaynaklardan üretilirler ve kontrolsüz düzen altında makro moleküllerin hasarına neden olurlar. Ancak aerobik organizmalar bu hasarları engellemek için çiftli oluşumlar ya da pasifleştirici mekanizmalar geliştirmişlerdir. Örneğin; ürik asit, oksidaz vasıtasıyla oluşturulan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), diğer enzimler tarafından (katalaz veya peroksidaz)  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dönüştürülür.

Metabolizma işlemlerinin normal gidişatında oksijen molekülü toplamda dört tane elektron kabul edebilmektedir. Oksijenin süperoksit anyona dönüşmesi için bir

elektron eklenmesi gerekir, iki elektron eklenirse hidrojen peroksit, üç tane elektron eklendiği durumlarda hidroksil radikali oluşur ve su oluşması için ise dört elektron eklenmesi gerekir (Özdem ve Şadan, 1994; Wickens, 2001). Oksijen metabolizması ürünlerinin azaltılması için organizmalarda enzimatik olarak kullanılan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) sayılabilir. Nonenzimatik olarak ise glutatyon (GSH) ve  $\alpha$ -tokoferol gibi moleküller ile hücrel savunma sistemleri kontrol edilebilmektedir (Wohaieb ve Godin, 1987; Wickens, 2001).

### 2.2.1. Singlet (Tekli) oksijen

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektrona sahip olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülü olarak bilinir. Moleküler oksijende eşleşmemiş iki dış elektronun spinleri aynıdır. Ancak farklı yörüngelerde bulunurlar. Moleküler oksijen yüksek enerji ile uyarıldığında bu eşleşmemiş elektronlardan biri ya kendi spininin tersi yönünde hareket eder ya da bulunduğu orbitalden başka bir orbitale geçiş yapar. Böylece singlet oksijen ortaya çıkar. Singlet oksijende eşleşmemiş elektronların spinleri birbirine zıttır. Singlet oksijenin iki farklı formu bulunmaktadır (Akkuş, 1995; Hurst ve ark., 1997; Perl-Treves ve Perl, 2002). Oksijenin yüksek enerjili bu formunun reaktivitesi, moleküler oksijene göre çok yüksektir. Singlet oksijen hem serbest radikal metabolizması sonucu meydana gelir hem de serbest radikal reaksiyonlarını başlatabilir. Radikal olmadığı halde çok reaktif olması ve radikal tepkimelerinin başlamasına neden olması sebebiyle radikal sınıfında kabul edilir. Biyolojik sistemlerde singlet oksijen; fotosentez reaksiyonları sırasında, hidrojen peroksitlerin metal iyonları varlığında vermiş oldukları reaksiyonlar esnasında, iyonize radyasyon ile uyarılma sonucu veya sitokrom P-450 tepkimeleri sırasında oluşabilir. Singlet oksijen, içerdiği enerjiyi çevreye dalga enerjisi olarak yayıp daha düşük enerji seviyelerine inerek, tekrar moleküler oksijene dönebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Akkuş, 1995; Stahl ve Sies, 2002).

### 2.2.2. Süperoksit radikali

Organizmada meydana gelen ilk radikal, süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikalidir. Çevresel etkenler, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla çok kolay bir şekilde oluşur. Biyolojik sistemlerde oksijen bir tane elektron alıp indirgendiği zaman oluşan serbest radikal süperoksit radikal anyonudur. Moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında elektron transport zincirindeki elektron kaçağı sonucu süperoksit radikali oluşur. Süperoksidin en büyük kaynağı elektron transport zinciridir. Her ne kadar süperoksit bir radikal olsa da reaktifliği yüksek değildir (Jialal ve Fuller, 1993; Akkuş, 1995).

### 2.2.3. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), içeriğinde paylaşılmamış elektron bulundurmadığı için radikal özellikte değildir. Demir ve bakır varlığında; zararlı ve reaktif hidroksil radikalinin öncülü olarak rol oynadığından reaktif oksijen türleri içerisine dahil edilir. Hidrojen peroksit proteinlerin yapısında bulunan gruptaki demirle etkileşerek reaktif demir formlarını oluşturur. Bu reaktif formdaki demir lipit peroksidasyonunun başlamasında etkili olabilir (Cheeseman ve Slater, 1993; Nordberg ve Arner, 2001). Hidrojen peroksit hücreler için toksik olup, özellikle indirgenmiş metal iyonlarıyla reaksiyona girdiğinde önemli serbest radikal hasarına neden olmaktadır (Erenel ve ark., 1992).

### 2.2.4. Hidroksil radikali

Oksijen radikalleri içerisinde en reaktif ve en zarar verici etkiye sahip olan tür, hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) olduğu yerde hiçbir ayırım yapmaksızın herhangi bir molekülle etkileşebilir. Bunun sebebi hidroksil radikalinin eşlenmemiş elektron bulunduran dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanmaktadır. Hemen etkileşime girdiği için de uzak mesafelere dağılmaz ve yarılanma ömrü çok kısadır (Kenneth ve Bruce, 1998; Yanbeyi, 1999). Hidroksil radikalinin istenmeyen zararlı etkilerin yanında, organizmanın normal işleyişi için de üretilmeleri gereklidir. Fagositoz ve diğer birçok enzimatik tepkimenin yapısına katılır (Kılınç, 1986). Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), olduğu yerde büyük hasara neden olur. Hücrede hemen hemen bütün yapılarla reaksiyona girebilir. Fosfolipidler, karbonhidratlar, proteinler, DNA gibi elektronca zengin birçok molekül hidroksil radikalinin hedefinde yer alır. Lipit peroksidasyonunu başlatabilir, lipit peroksidasyonu ise hücre zarının geçirgenliğini artırabilir. Yapısını bozarak da hücre ölümüne yol açabilir. DNA üzerinde kırılmalara ve mutajenik etkilere neden olur. Radikal olmayan biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek zincirleme reaksiyonları başlatabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

### 2.2.5. Nitrik oksit radikali

Nitrik oksit (NO), inorganik bir serbest radikaldir. NO, metabolizma içerisinde birçok göreve sahiptir. Geçmişte sadece çevre kirliliğine sebep olan bir molekül olarak kabul edilmiştir. Günümüzde ise makrofaj ve nötrofiller gibi hücreler tarafından sentezlenip metabolik sürece dahil oldukları anlaşılmıştır. NO'nun kan basıncı üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. NO, süperoksit ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. NO, süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit, nitrik okside göre daha az stabildir. Fakat nitrik oksitten daha toksik özellik gösterir. Peroksinitritin

protonlanmasıyla da oldukça etkili olan peroksinitröz asit meydana gelir. NO'nun ortamda birikmesi, nöronlarda ileri derecede hasarın oluşmasına neden olur. Yağda çözünebilir nitrik oksit, biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilir. Oldukça basit bir yapıya sahip olmasına rağmen farklı ve zıt etkilere sahiptir. NO, bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipit peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Bununla birlikte süperoksitle reaksiyona girerek prooksidan olarak davranır. Metabolizmada nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile üretilir. Nitrik oksit, güçlü bir damar düz kas gevşeticisi olarak görev yapar (Simonian ve Coyle, 1996; Lala ve Chakraborty, 2001).

### **2.3. Serbest Radikal Kaynakları**

Biyolojik sistemlerdeki birçok önemli serbest radikal oksijen kaynaklı meydana gelen radikallerdir (Akkuş, 1995). Serbest radikal oluşmasına neden olan kaynaklar ikiye ayrılmaktadır. Bunlar; eksojen ve endojen kaynaklardır. Eksojen kaynaklar arasında; organik çözücüler, ilaçlar, anestezikler, UV, radyasyon, sağlıksız çevre koşulları, zararlı alışkanlıklar, fazla yağlı beslenme vb. sayılabilir. Endojen kaynaklar ise; oksijenli solunum, mitokondrilerdeki elektron taşıma zinciri, oksidatif stres, fagositoz yapan hücreler, kronik hastalıklar, oksidan enzimler, plazma membranı, ağır egzersizler ve benzeri durumlarıdır (Nelson ve Cox, 2004; Gürdöl ve Ademoğlu, 2006).

### **2.4. Serbest Radikallerin Etkileri**

#### **2.4.1. Serbest radikallerin yararlı etkileri**

21. yüzyılda, yapılan araştırmaların çoğu, canlı organizmaların serbest radikallerin yararlı kullanımını için bazı mekanizmalar geliştirmiş olduğunu göstermektedir. İlimli konsantrasyonlarda üretilen reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri hücrel yapıların olgunlaşma süreci için gereklidir, insan sağlığı için hayati öneme sahiptir ve bağışıklık sistemi için kalkan olarak hareket edebilir. Nötrofiller, makrofajlar ve monositlerin de dahil olduğu fagositik hücreler, hastalıklara karşı vücudun savunma mekanizmasının bir parçası olarak süperoksit ve nitrik oksit radikali üreterek patojenlere karşı serbest radikalleri kullanırlar. Bundan başka, vücudun normal metabolizması sırasında doğal olarak üretilen serbest radikallerin bazıları hücrel sinyal iletiminde ikincil haberci olarak görev yapmaktadırlar (Reddy ve ark., 2010).

#### **2.4.2. Serbest radikallerin zararlı etkileri**

Fizyolojik şartlar altında serbest radikaller sürekli üretilirler ve hücrel fonksiyonlar için gereklidir. Ancak, bu serbest radikallerin üretilme hızları ile yıkım hızları arasında hassas bir denge durumu vardır, bu durum "oksidatif denge" adını alır. Bazen antioksidan savunma mekanizmasının ortamdaki kaldırabileceğinden daha çok

serbest radikal meydana gelebilir. Bu durumda ise oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Oksidatif stres durumunda organizmada denge oksidanlar yönüne kayarak hücrede hasarlara yol açabilmektedir. Oksidatif stres koşullarında biyolojik sistemlerde serbest radikal miktarlarında artış olmaktadır ve bu yüzden de bu ürünlerin reaksiyon hızlarında artış meydana gelir. Bu durumdan ise birçok metabolik sistem olumsuz etkilenmektedir (Halliwell, 2006).

### **2.5. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemleri**

Son yıllarda fizyoloji, farmakoloji, gıda ve gıda endüstrisi gibi alanlarda antioksidanlar üzerine yapılan araştırmalar, antioksidanların öneminin gittikçe arttığını göstermektedir. Öyle ki, "antioksidan" ifadesi uluslararası alanda kabul edilmiş bir tanım ile sınırlandırılmamıştır. Gıda endüstrisinde antioksidanlar, "kolaylıkla okside olabilen besin maddelerinin oksidasyonu sonucunda, bu maddelerin tatlarının acılaşmasını, ekşimesini ve kokularının bozulmasını önleyebilen, geciktirebilen veya durdurabilen maddeler" olarak tanımlanmıştır (Becker ve ark., 2004). Lipitlerden başka karbonhidratlar, proteinler ve DNA gibi okside olabilen diğer tüm makro molekülleri de kapsayan diğer bir tanım; Halliwell ve Gutteridge (1995) tarafından, "yükseltgenebilir özellikteki bir substratla kıyaslandığında, düşük konsantrasyonlarda söz konusu substratın oksidasyonunu geciktiren ya da inhibe eden moleküller" şeklinde ifade edilmiştir. Fakat daha sonra bu terim Halliwell (2007) tarafından "aynı substratın hedef molekülde oluşturduğu oksidatif hasarı azaltan, geciktiren veya engelleyen maddeler" şeklinde verilmiştir. Aynı yıl, "doğrudan reaktif oksijen türlerini temizleyen ya da dolaylı olarak antioksidan savunma mekanizmasını uyaran veya reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe eden maddeler" şeklinde tanımlanmıştır (Khlebnikov ve ark., 2007).

Antioksidanlar, gıda ürünlerinde kaliteyi ve besin değerlerini korumak amacıyla sonradan ilave edilebildikleri gibi, besin maddelerinde doğal olarak da bulunurlar. Bunlar besinlerin tatlarının acılaşmasını, ekşimesini ve kokularının bozulmasını geciktiren kimyasal madde gruplarıdır. Antioksidanlar genellikle yağlarda meydana gelen oksijen sebebiyle otooksidasyonu önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu işlem sonucunda yağların kalitesi ve raf ömrü uzatılmaktadır. Antioksidanlar ancak insan sağlığına zararı olmadığı kesinleştikten sonra gıdalarda kullanılmalıdır (EFSA, 2012). Piyasada en çok kullanıldığı bilinen sentetik antioksidan çeşitleri; bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ)'dur (Türk Gıda Kodeksi, 2008).

İndirgeyici özellik gösteren antioksidanlar prooksidan olarak etki edebilirler. Ortamdaki antioksidan madde konsantrasyonunun artması ile oksidasyonun aynı oranda önlenmesi arasında doğru orantının olduğunu düşünmek yanlıştır. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda fenolik antioksidanlar, antioksidan özelliklerini yitirirler ve oksidasyonu hızlandırıcı etki gösterirler (Laughton ve ark., 1989). Bu etkiye “prooksidan etki” denir.

Prooksidanlar, ROT’ ları oluşturarak ya da antioksidan sistemleri inhibe ederek oksidatif strese neden olan kimyasallardır (Puglia ve Powell, 1984). Prooksidanların ve antioksidanların metabolitik yollardaki ve hücrelerin korunmasındaki hayati rolü hiç şüphe yok ki elzemdir. Ancak, son yıllarda bazı araştırmalardaki birbiri ile çelişen ifadeler, bilim insanlarını daha detaylı araştırmaya zorlamıştır. Serbest radikaller prooksidan olarak kabul edilirken, antioksidanların da prooksidan etki gösterebilmeleri şaşırtıcıdır (Carocho ve Ferreira, 2013). Örneğin, C vitamininin yüksek konsantrasyonlardaki antioksidan aktivitesinin yanında, düşük konsantrasyonlarda prooksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. C vitamini  $H_2O_2$  gibi oksidan molekülleri indirgediğinde antioksidan aktiviteye sahiptir (Duarte ve Lunec, 2005; Du ve ark., 2012), fakat C vitamini metal iyonlarını da indirger ve indirgenme ile oluşan katyonlar Fenton reaksiyonu aracılığıyla serbest radikal oluştururlar.

Antioksidanlar hücrelere zarar veren serbest radikalleri ve ROT’ların meydana getirdikleri hasarları hücre içinde (enzimatik) ve hücre dışında (enzimatik olmayan) savunma mekanizması ile etkisizleştirirler (Tarpey ve ark., 2004). Hücre içi savunma süperoksit dismutaz, glutatyon S- transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidaz gibi enzimler tarafından sağlanırken, hücre dışı savunması ise albümin, bilirübin, transferrin, seruloplazmin, ürik asit, koenzim Q10 gibi farklı moleküllerle sağlanır (Carocho ve Ferreira, 2013).

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlama, ortamdaki radikalleri yok etme, hasarlı moleküllerin tamiri ve temizlenmesi gibi farklı mekanizmalarla etkilerini gösterirler. Bir başka deyişle serbest radikallerin nötralize edilmesini sağlayarak organizmanın bunlardan etkilenmesini önleyen ve kendisinin yenilenmesine yardım eden maddelerdir. Antioksidanların etki tipleri 4’e ayrılır (Akkuş, 1995):

Toplayıcı (Scavenging) Etki: Serbest radikallere etki ederek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküllere dönüştürmeye denir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz

(CAT), peroksidaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) gibi enzimler; EDTA, fitik asit gibi metal şelatlayıcıları örnek olarak verilebilir.

**Bastırıcı (Quencher) Etki:** Serbest radikallerle etkileşerek onlara bir tane hidrojen aktarılması ve aktivitelerini azaltmaya veya inaktif hale getirme bastırıcı etki olarak bilinir. Antioksidan vitaminler (E ve C), flavonoidler, antosiyaninler ve mannitol örnek olarak verilebilir.

**Onarıcı (Repair) Etki:** ROT'ların oluşturduğu hasarın onarılmasıdır.

**Zincir Kırıcı (Chain Breaking) Etki:** Reaktif oksijen türlerini kendilerine bağlayarak zincirleme olarak devam eden reaksiyonların belirli yerlerden kırılıp radikallerin fonksiyonlarını engelleme işlemidir. Hemoglobın, seruloplazmin, bilirübin, ürik asit ve mineraller örnek olarak verilebilir.

## **2.6. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar için birden fazla şekilde sınıflandırma yapmak mümkündür. Endojen (doğal) ve eksojen kaynaklı olarak sınıflandırılabilirler gibi, enzimatik ve non-enzimatik (enzim olmayanlar) olarak da sınıflandırılabilirler.

İnsanlardaki antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve non-enzimatik olarak başlıca iki ana gruba ayrılır. Enzimatik savunma sistemi de kendi arasında birincil ve ikincil; non-enzimatik savunma ise flavonoidler, fenolik asitler, vitaminler, karotenoidler, mineraller, kofaktörler, non-proteinojen azotlu bileşikler ve organosülfür bileşikleri gibi alt gruplara ayrılabilirler.

### **2.6.1. Endojen (doğal) antioksidanlar**

#### **2.6.1.1. Enzimatik olan antioksidanlar**

En bilinen enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), hidroperoksidaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD)'dir.

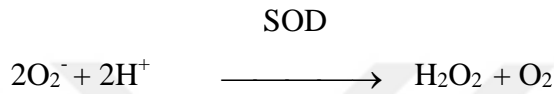
SOD, CAT ve GSH siklusunu enzimleri (GSH-Px, GR, G6PD) reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ve zararlı metabolitlere çeviren antioksidan enzimlerdendir (Özdem ve Şadan 1994; Aslan ve ark., 1995). Süperoksit radikalini detoksifiye eden enzim ise solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz enzimidir (Akkuş, 1995).

#### **2.6.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)**

Süperoksit dismutaz (SOD, E.C. 1.15.1.1) antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturur. SOD (süperoksit dismutaz) enzimi, süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikalinin

hidrojen peroksida ( $H_2O_2$ ) dönüşümünü katalizler. Normal metabolik süreç boyunca oksijenin kullanılması sonucu yüksek miktarda süperoksit radikali oluşur. Yüksek miktardaki süperoksit radikali hücre için oldukça tehlikelidir. Ancak hücre içi  $O_2^{\cdot-}$  oranı SOD tarafından belirli bir seviyenin altında tutulur. Böylece  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin hücreye zarar vermesi engellenmiş olur. Oksijen kullanımı fazla olan dokulardaki SOD aktivitesi,  $O_2$  kullanımı az olan dokulardaki SOD aktivitesine oranla daha yüksektir. Hücre dışı SOD aktivitesi ise oldukça düşüktür (Çakır, 1997; Kaminaka ve ark., 1999).

SOD enzimi süperoksit anyonunu ( $O_2^-$ ) enzimatik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür.

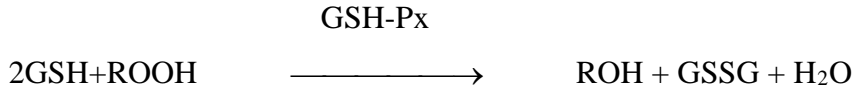


Fizyolojik olarak metabolik aşamalarda üretimi oldukça fazla olan süperoksit, hücre içi aktivitesini düşük tutarak hücre içi  $O_2^-$  düzeylerinin kontrolünde ve hücreleri  $O_2^-$  radikalinin etkilerinden korumada görev alır. Spontan olarak da oluşabilen bu reaksiyon SOD katalizörlüğünde yaklaşık 4000 kez daha hızlı oluşur. SOD enzimi hemen hemen bütün aerobik organizmalarda bulunan bir metalloenzimdir (Fridovich, 1995; Bast ve ark., 1997; Perl-Treves ve Perl, 2002).

Üç büyük SOD tipi bildirilmiştir. Cu, Zn ve Mn (bakır, çinko ve manganez) içeren birer enzim ökaryotik hücrelerde bulunmuştur. Cu, Zn içeren enzim sitoplazmada, Mn içeren enzim ise mitokondride bulunmaktadır (Kahraman, 1998).

#### **2.6.1.1.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)**

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyen önemli bir sitozolik enzimdir. GSH-Px'in molekül ağırlığı yaklaşık 85.000 daltondur. Sadece sitozolde değil aynı zamanda mitokondride de aktivitesi vardır. Fakat mitokondrideki aktivitesi sitozoldekine göre daha düşüktür. Glutasyon peroksidaz, aktif bölgesinde bulundurduğu selenyum (selenosistein formunda) nedeniyle selenyuma bağımlı GSH-Px olarak adlandırılır. Bu da kısa olarak Se-GSH-Px şeklinde belirtilir. Fakat bazı GSH-Px yapıları selenyum bulundurmaz. Selenyum bulundurmeyen bu peroksidaz enziminin de lipit peroksitlere ve hidrojen peroksitlere karşı aktivitesi vardır. Fakat bu aktivite oldukça düşüktür (Gey, 1990; Akkuş, 1995).



Glutasyon peroksidaz enzimi hidrojen peroksidin veya organik peroksitlerin indirgenmesini katalizlerken glutasyonu (GSH) elektron akseptörü olarak kullanır. Bu reaksiyonlar sonucu yükseltgenen glutasyon miktarı ise sınırlıdır. Okside olan glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enzimi vasıtasıyla redükte forma dönüştürülerek tekrar kullanıma hazır hale getirilir.



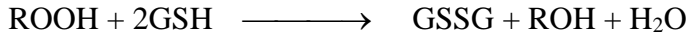
Glutasyon peroksidaz aktivitesindeki düşüş hidrojen peroksit konsantrasyonunun artmasına yol açar. Bu da şiddetli hücre yıkımına neden olur. Özellikle eritrositlerin hemoliz olması ciddi hasara yol açar (Mannervick, 1985; Michiels ve ark., 1994; Akkuş, 1995; Cnubben ve ark., 2001).

Glutasyon peroksidazın yapısında selenyum bulundurmeyen türleri glutasyon-S-transferaz olarak isimlendirilir. Bu grup üyeleri glutasyon ile elektrofilik bileşikler arasında konjugasyonu katalizleyen yapılar olarak tanımlanır. Selenyum bağlı glutasyon peroksidazlar beş farklı grup altında sınıflandırılırlar. Bütün hücrelerde eksprese edilen tetramerik yapıdaki sitozolik GSH-Px, GSH-Px 1 olarak isimlendirilir. GSH-Px 1 daha çok eritrositlerde ve böbrekte lokalize olmuştur. GSH-Px 2 olarak nitelendirilen bir diğer grup ise insanlarda daha çok karaciğer ve gastrointestinal kanalda eksprese edilir (Akkuş, 1995; Cnubben ve ark., 2001).

#### **2.6.1.1.3. Glutasyon -S- transferazlar (GST)**

Glutasyon-S-Transferaz (GST), (EC 2.5.1.18) selenyuma bağlı olmayan glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi göstererek antioksidan savunmaya katılan izoenzimlerden oluşan bir enzim ailesinden oluşur. Dimerik yapılı glutasyon-S-transferazlar, başta araşidonik asidi ve lineolat hidroperoksitler olmak üzere lipit peroksitlerine karşı antioksidan aktivite gösterirler (Nelson ve Cox, 2000; Erat, 2002).

## GST



Homodimerik ve heterodimerik enzimler olan GST'lerin araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bu enzim ailesinin hayati öneminin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptir (Akkuş, 1995).

GST'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptir. GST'ların hücre içinde taşıyıcı ve bağlayıcı rollerinin yanı sıra detoksifikasyon görevleri de vardır.

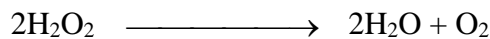
Katalitik olarak; ksenobiyotikleri GSH'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlar ve elektrofilik bölgeleri nötralize ederek ve ürünlerin suda daha fazla çözünür durumda olmasını sağlar. Oluşan GSH konjugatları böylece biyolojik sistemlerden uzaklaştırılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Ayrıca metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlayarak hücre içinde az miktarda çözünebilen moleküllerin depolanması ve taşınmasında görev alırlar (Akkuş, 1995).

#### 2.6.1.1.4. Katalaz (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6) bütün aerobik hücrelerin hemen hepsinde bulunur. Özellikle eritrosit ve karaciğerde yüksek konsantrasyonda mevcuttur. Katalaz enziminde dört adet hem grubu bulunur ve bir hemoproteindir. Ayrıca her alt birim NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında görev almaktadır. Katalaz enziminin (CAT) görevi, hidrojen peroksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oksijen ve suya parçalamaktır. Böylece  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in ortamda birikmesi ve çok tehlikeli bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşması önlenmiş olur (Michiels ve ark., 1994; Akkuş, 1995; Nicholls ve ark., 2000).

Hücre içinde daha çok peroksizomlarda lokalize olmuş durumdadır. Ayrıca sitoplazma, mitokondri ve endoplazmik retikulumda da aktivite göstermektedir (Lardinnois, 1995; Akkuş, 1995). Yapısında bulundurduğu demir sayesinde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin suya dönüştürülmesinden sorumlu bir enzimdir.

## Katalaz



İnsan eritrositlerinde önemli miktarda katalaz bulunmasına rağmen, hidrojen peroksidin buradan uzaklaştırılmasındaki temel mekanizmanın NADPH, glutatyon redüktaz / peroksidaz yolu olduğu düşünülmektedir (Gaetani ve ark., 1989).

#### 2.6.1.1.5. Glutatyon redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz (GR) enzimi (E.C.1.8.1.7) ilk olarak 1951'de tanımlanmıştır. GR enzimi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer organik haldeki peroksitler indirgenirken glutatyon peroksidaz enzimi aracılığıyla yükseltgenen glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmesi için gerekli reaksiyonu katalizler. Bu işlemler sonucunda canlıda bulunan sınırlı sayıdaki glutatyon (GSH) molekülü tekrardan kullanılabilir hale dönüşmüş olur. Tüm bu reaksiyonların meydana gelebilmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır. İhtiyaç duyulan NADPH pentoz fosfat metabolik yolundan sağlanır. Burada glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimi ile glutatyon redüktaz enziminin aralarındaki ilişki ortaya çıkar. G6PD enziminin çalışmaması, NADPH üretimini; NADPH miktarının azalması glutatyon redüktazın işlerliğini; GR aktivitesinin düşmesi de GSH oluşumunu etkiler (Akkuş, 1995; Çiftçi ve ark., 2001; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Yüksek GSH ve düşük GSSG düzeyleri önemlidir, çünkü yüksek GSSG düzeyleri protein sülfidrilleriyle reaksiyona girer ve proteinleri inaktive eden karışık glutatyon-protein sülfidrilleri oluşturur. Gerekli GSH-GSSG oranları GR ve G6PD enzimleri tarafından devam ettirilir. NADPH'ın G6PD ile üretimi de oksijen hasarının tamirinde gerekli biyosentetik süreçlerde önemli olabilir (Erenel ve ark., 1992). GR aktivitesi, NADPH kullanılarak GSSG'nin GSH'a indirgenmesi sırasında NADPH'ın oksidasyonunun spektrofotometrik olarak izlenmesi ile belirlenir. Glutatyon redüktaz enzimi hücre içi GSH/GSSG oranını yükselterek özellikle eritrositleri hemolizden korur (Akkuş, 1995; Mullineaux ve ark., 1996; Lamotte ve ark., 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Bülbül ve Erat, 2008).

#### 2.6.1.2. Enzimatik olmayan (Nonenzimatik) antioksidanlar

Nonenzimatik antioksidanlardan endojen olanlar: glutatyon, sistein, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin, eksojen antioksidan olanlardan vitaminler:  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),

$\beta$ -karoten-retinol (vitamin A), askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat), minerallerden ise selenyum, bakır, çinko, polifenoller ve flavonoidleri sayabiliriz.

CAT ve GSH-Px gibi enzimler oldukça reaktif hidroksil türlerinin hasar oluşturan etkilerine karşı, sadece sınırlı bir koruma sağlayabilirler. Bununla birlikte bir seri düşük molekül ağırlıklı serbest radikal temizleyiciler (antioksidanlar) direkt reaksiyona girerek onları daha az zararlı ve daha stabil türevlerine dönüştürebilirler (Erenel ve ark., 1992).

Enzimatik olmayan karakterdeki redoks reaksiyonlarında serbest radikal oluşumu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Serbest bir radikalın meydana gelebilmesi için, iki bağı olan bir molekülün bir tek bağının başka bir molekülün etkisi ile yükseltgenmesi ya da indirgenmesi gerekmektedir (Thurnham, 1990).

Enzimatik olmayan yapıdaki bu maddeler, GSH, ürik asit, taurin ve yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar olan mukus ve albümindir (Özdem ve Şadan, 1994). Diğer nonenzimatik antioksidanlar, melatonin, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, miyogloblin ve hemoglobindir (Akkuş, 1995).

#### **2.6.1.2.1. Glutasyon (GSH)**

GSH tripeptit yapısında olan, glutamik asit, sisteinler ve glisin aminoasitlerinden oluşan bileşiktir. Biyolojik sistemlerde önemi yüksek antioksidanlardan olan GSH, hücrelerde peroksit ve serbest radikaller ile etkileşime girerek onları oksidatif hasara karşı korumaktadır. Proteinlerin -SH gruplarının redükte durumda kalmasını sağlayarak, protein ve enzimlerin inaktivasyonuna engel olur. Bu görevleriyle beraber yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membranlardan geçişini de sağlar (Akkuş, 1995).

İndirgenmiş glutasyon reaktif ksenobiyotiklere karşı hücrel membran yapılarını korumaya iştirak ettiği bilinen önemli hücrel redoks tepkimelerinde potansiyel biyolojik madde olarak görev alır. Bu önemli fonksiyonları bize devamlı azalan GSH konsantrasyonunun yaşlanma prosesleri ve neoplastik hastalıklarda kolaylaştırıcı faktör olabileceğini göstermiştir (Laganier ve Yu, 1989).

#### **2.6.1.2.2. Melatonin**

Güçlü antioksidanlardan olan melatonin, en kuvvetli radikal olarak bilinen hidroksil radikalının etkisini azaltır. Bu nedenle günümüzde bilinen en kuvvetli antioksidanlardan biridir. Melatoninin önemli diğer bir özelliği ise lipofilik özellikte olmasıdır. Bu yüzden hücrenin tüm organellerine ve çekirdeğine ulaşabilir, kan-beyin bariyerini aşabilir özelliktedir. Tüm bu nedenlerden dolayı geniş bir alanda antioksidan

aktivitesini sergileyebilir. Melatoninin diğeri bir özelliği ise yüksek dozda kullanıldığında bile herhangi bir toksisitesinin olmamasıdır. Melatoninin hücre çekirdeğine kolayca girebilmesi ve DNA'yı serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyabilmesi özelliğinden dolayı diğeri antioksidanlardan daha üstün bir niteliktedir. Yaşın ilerlemesi ile paralel olarak melatonin üretim miktarı azalmaktadır bu durumun da yaşlanma ve yaşlılığa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli olduğu düşünölmektedir (Akkuş, 1995).

## **2.6.2. Eksojen antioksidanlar**

### **2.6.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar**

#### **2.6.2.1.1. Vitamin C (Askorbik Asit, AA)**

Suda çözünen bir vitamin olan L-askorbik asit, bitkilerin yaprak kısımlarında özellikle kloroplastlarında yaygın olarak bulunur (Cadenas ve Packer, 2002). Birçok hayvanda karaciğeri ve böbrek hücrelerinde glikozdan sentezlenebilmektedir. İnsanda ise gerekli enzim bulunmadığından C vitamini sentezlenemez. İnsanlar bu vitamini beslenme yoluyla almaktadırlar (Gürdöl ve Ademoğlu, 2006).

Yeşil sebze ve meyvede ayrıca turunçgillerde C vitamini bolca bulunmaktadır. C vitaminini en çok ihtiva eden meyveler; domates, frenk üzümü, turunçgiller, ananas ve çilektir. Sebze olarak ise; yer elması, maydanoz, kuru soğan, karnabahar, lahana, ıspanak, biber ve tere zengin C vitamini kaynaklarıdır (Cadenas ve Packer, 2002).

Organizmadaki pek çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici olarak iş yapan L-askorbik asit, altı karbonlu bir ketolakton yapısına sahiptir ve iki adet kolaylıkla iyonize olabilen hidroksil grubu içermektedir. L-askorbik asit, bu sayede birbirini takip eden iki basamakta birer elektron yükseltgenerek, kolaylıkla askorbat radikaline (Asc•-) ve dehidroaskorbik aside (DHA) oksitlenir. Güçlü bir indirgeyici olduğu için kuvvetli bir antioksidan da olan C vitamini birçok serbest radikalle reaksiyona girerek bunları yok eder. C vitaminin farklı türdeki yağları ve yağ içeren diğeri besin maddelerini oksidasyona karşı koruduğu bilinmektedir. C vitamini, antioksidan etkisinin yanı sıra oksidan etkiler de sergileyebilir. Bazı metabolik özelliklerinden dolayı askorbik asit; serbest radikal reaksiyonlarında işlev gören önemli bir katalist ya da bir prooksidan olarak değerlendirilebilmektedir (Paolini ve ark., 1999).

#### **2.6.2.1.2. Vitamin E ( $\alpha$ Tokoferol)**

E vitamini etkisi gösteren sekiz bileşik bilinmektedir. Bunlar içinde en aktif olup en bol bulunanı  $\alpha$ -tokoferoldur. Tokoferollar antioksidan olarak bilinirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Bu vitamin, lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu bir serbest radikal temizleyici olarak davranır. Lipitte çözünür doğası, hücre zarlarının fosfolipit tabakası ve kan lipoproteinleri içerisinde yoğunlaşmasına izin vermektedir. Her bir E vitamini molekülü iki oksidasyon zincirini durdurur. Çünkü vitamin E radikali zincirin devamı için çok az reaktiftir. Vitamin E, askorbik asit tarafından rejenere edilebilmektedir (Erenel ve ark., 1992).

#### **2.6.2.1.3. Karotenoidler ( $\beta$ -karoten)**

Karotenoidler, yağda çözünen bileşiklerdir ve bitkilerde renk pigmentleri olarak doğal halde bulunurlar. Karotenoidlerin suda çözünürlüğü oldukça zayıf olup, sarı ve koyu yeşil renklidirler. Sebze ve meyvelerde bulunurlar ve çoğunlukla buldukları bitkilerin karakteristik rengini verirler. Kayısının, kavunun, havucun sarı-turuncu rengi karotenoidlerden kaynaklanır (Durmaz, 2002).

$\beta$ -karoten ve diğer bazı karotenoidler, A vitamini öncülü maddelerdir.  $\beta$ -karoten karoten dioksigenaz enziminin yardımıyla A vitaminine dönüşür. Vücutta  $\beta$ -karotenin A vitaminine dönüşümü ihtiyaca bağlıdır. Yani vücudun ihtiyacı kadar A vitamini üretilir ve geriye kalanlar karotenoid olarak işlev görür (Durmaz, 2002).

Vitamin A, peroksil radikalleri ile onlar lipit peroksidasyonunu başlatıp hidroperoksitlerin üretimini yaymadan önce birleşir ve böylece zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür. Retinol etkili bir peroksil radikali süpürücüsüdür (Vince, 1999).

#### **2.6.3. Sentetik antioksidanlar**

Bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen yağları, oksidasyona karşı korumak için bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), TBHQ (ter-bütül hidrokinon), propil gallat (PG) ve oktil gallat (OG) benzerleri sentetik yapıdaki antioksidanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte yapılan araştırmalarda, sentetik yapıdaki bazı antioksidanların toksik ve karsinojenik olmak üzere sağlık üstüne bazı riskler taşıdığı bildirilmektedir (Bouaziz ve ark., 2010).

##### **2.6.3.1. Bütillenmiş hidroksianisol**

BHA iki izomerinin karışımı halinde bulunur. Bunlar, % 90 oranında 3-tert-bütül-4-hidroksianisol ve % 10 oranında 4-tert-bütül-4-hidroksianisol'den ibarettir (EFSA, 2011). Hem bitki kökenli hem de hayvansal yağlarda kolayca çözünen, suda çözünmeyen, etkili sentetik yapıli antioksidanlardandır.

BHA, katı ve sıvı yağlar, yağ içeren gıdalar, gıda kaplama malzemeleri, bal mumları ve uçucu yağ içeren gıdalarda, işlenmiş kabuklu ürünler, baharat ve çeşnilerde kullanılmaktadır (Türk Gıda Kodeksi, 2008).

### 2.6.3.2. Bütillenmiş hidroksitoluen

BHT (2,6-di-tert-bütil-p-kresol) bitkisel ve hayvansal yağlarda çözünür, suda çözünmez. Beyaz, kristalize toz halindedir.

Gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan sentetik antioksidanlardan birisidir. Balık ürünleri, ambalaj malzemeleri, parafin ve mineral yağlarda kullanıldığı gibi kek karışımları, hububat bazlı çerezler, toz çorba ve et suları, katı ve sıvı kızartma yağları (zeytinyağı ve pirina yağı hariç) gibi ürünlerde de kullanılır (Türk Gıda Kodeksi, 2008).

### 2.6.3.3. Tersiyer bütil hidrokinon

IUPAC ismi; 2-(1,1-Dimetiletil)-1,4-benzendiol olan TBHQ, oldukça güçlü bir antioksidandır. Gıda olarak tüketilen doymamış bitkisel yağlarda ve hayvansal yağlarda koruyucu olarak kullanılır.

Hem Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) hem de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gıdalarda kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir. FDA tarafından gıdalardaki kullanımı besinin yağ içeriğinin % 0.02'si ile sınırlandırılmıştır (EFSA, 2004).

### 2.6.3.4. Propil galat

Propil gallat (propil 3,4,5-trihidroksibenzoat) beyaz ve kokusuz toz halde bulunan bir maddedir. Yiyeceklerin, yağların ve medikal preparatların tazeliğini, besin değerini, aromasını ve rengini korumak ve dengelemek için yaygın olarak kullanılan bir antioksidandır. Etanolda yüksek oranda çözünürken, suda az çözünür. Yapılan çalışmalar sonucu propil gallatın mide-bağırsak yolunda absorplandığı belirlenmiştir (Zurita ve ark., 2007).

### 2.6.3.5. Nordihidroguayeretik asit

Nordihidroguayeretik asit (NDGA) ağırlıkça % 0.001-0.01 arasında değişen oranlarında cilt bakım sistemlerinde kullanılan güçlü bir antioksidandır. Yapılan çalışmalarda, UV ışınlarına maruz kalma sonucunda oluşan keratozise karşı, serbest radikal süpürücü ve koruyucu bir ajan olarak etki ettiği bildirilmiştir (Sreekumar ve ark., 2006). Ayrıca, erkek fareler üzerinde yapılan bir araştırmada NDGA'nın hem antioksidan hem de antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Strong ve ark., 2008).

## 2.7. Antioksidan Etki Tipleri

Serbest radikal ve ROS'ların meydana gelmesini ve bunlardan kaynaklanan hasarları önlemek için organizmalarda çok sayıda savunma mekanizmaları

bulunmaktadır. Bu mekanizmalara “antioksidan savunma sistemleri” ya da kısa olarak "antioksidanlar" denilmektedir. Antioksidanlar etki tiplerini; radikalleri toplayıcı etki reaksiyonları, radikalleri bastırıcı etki reaksiyonları, radikal zararını onarıcı etki reaksiyonları ve zincir kırıcı etki reaksiyonları olarak dört şekilde gösterir (Harris, 1992).

Serbest oksijen radikallerinin tutulup daha zayıf bir formdaki moleküle çevrilmesi işlemine toplayıcı etki denilmektedir. Antioksidan yapıdaki enzimler, trakeobronşiyal mukus ve diğer bazı küçük yapıdaki moleküller bu şekilde etkili olurlar. Bastırıcı etki de ise; serbest radikallere hidrojen bağı aktararak etkisiz hale getirilir. Vitamin ve flavonoidler bu gruba dahildir. Serbest radikal moleküllerini kendine bağlayarak zincirlerinin kırılıp işlevlerinin engellenmesi etkisine, zincir kırıcı etki denmektedir. Seruloplazmin, hemoglobin ve mineraller bu şekilde zincir kırıcı etki gösterirler (Akkuş, 1995). Serbest radikallerin oluşturdukları hasarların onarılmasındaki etkilerine de onarıcı etki adı verilir.

## **2.8. Oksidatif Stres**

Elektron veya elektronların, bir atom veya molekülden ayrılarak başka bir atom veya moleküle geçmesini sağlayan kimyasal tepkimeye oksidasyon ya da yükseltgenme denir. Yükseltgenme potansiyeli diğerine göre daha düşük olan ise indirgenmiş olur. Organizmada ve besinlerdeki yağlar, proteinler, karbonhidratlar ve diğer organik komponentler oksidasyona maruz kalabilmekte ve biyolojik sistemler için zararlı metabolitler olan reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilmektedir (Papaz, 1996).

Organizmada meydana gelen serbest radikaller, hücrenin savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılır. Bu savunma sistemine antioksidanlar adı verilir. Serbest radikallerin oluşması ile antioksidan savunma mekanizması bir denge halindedir. Yani serbest radikallerin meydana gelme hızı ile ortamdan temizlenme hızları birbirine eşittir. Bu duruma oksidatif denge denir. Oksidatif denge var olduğu sürece, metabolizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Fakat bazı durumlarda antioksidanların savunma kapasitesini aşan serbest radikal oluşumu söz konusu olabilir. Çeşitli endojen ve eksojen faktörlerin etkisiyle artan radikal oluşumu veya azalan antioksidan savunması, var olan oksidatif dengeyi bozar. Antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması ve serbest radikallerin yüksek miktarlara ulaşması sonucu oluşan bu duruma oksidatif stres denir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Antioksidan savunma sistemine rağmen, serbest radikallerin hücrelere değişik düzeyde zarar vermesi kaçınılmazdır. Şiddetli oksidatif stres, hücrede hasara ve hücre

ölümüne yol açar. Oksidatif stresin vereceği zarar, stresin şiddetine, etkilenen molekülün türüne, antioksidan savunmanın kapasitesine göre değişmektedir (Akkuş, 1995).

Oksidatif stres; proteinler, membran lipitleri, DNA gibi önemli birimlerde hasara sebep olur. Özellikle DNA üzerinde nükleik asitleri hasara uğratmakta ve kansere sebep olabilmektedir. Düşük seviyedeki oksidatif stresin etkileri çok uzun bir süreç sonucunda ortaya çıkarken (yaşlanma vb.), yüksek şiddetteki oksidatif stresin etkileri kısa sürede ve ciddi hastalıklar olarak gözlemlenir. Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarı sebebiyle birçok kronik hastalığın ortaya çıktığı belirtilmektedir. Bu hastalıkların bazıları ateroskleroz, gebelik preeklampsisi, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, KOAH, karsinogenezis, parkinson, down sendromu, iskemi-reperfüzyon injürisi olarak sayılabilir (Bowler ve Crapo, 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Keser, 2005).

### 2.9. Polifenolik Bileşikler

Polifenoller, fitokimyasalların en geniş sınıflarından biridir (Tsao, 2010). Bitkiler aleminde oldukça geniş çapta yer almaktadırlar. Polifenollerin antioksidan aktivitelerini, kimyasal yapılarındaki hidroksil grupları belirler. Bu nedenle de güçlü antioksidanlardır. Bitkisel kökenli polifenolik bileşikler, hidrojen atomu vericisi, singlet oksijen süpürücü ve indirgeyici gibi birçok fonksiyona sahiptir. Diğer bazı polifenoller de antioksidan özelliklerini metal iyonlarını şelatlayabilme özelliğinden alırlar. Polifenolik bir bileşiği antioksidan olarak tanımlayabilmemiz için iki ana özelliğe sahip olması gerekmektedir (Cadenas ve Packer, 2002). Bunlar; ilk olarak yükseltgenebilen substratlara göre düşük miktarlarda bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir. İkinci olarak ise; giderme işlemi sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır.

Polifenolik antioksidanlar (PPH), peroksi radikaline (ROO•) hızlı bir şekilde hidrojen atomu vererek, bu radikali alkil hidroperoksit (ROOH) yapısına dönüştürürler. Böylece lipit peroksidasyonunu inhibe eder.



Besin fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılır:

### 2.9.1. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerin ortak bileşenleridir. Çeşitli bitkilerin kök, gövde, yaprak, tohum ve meyvelerinden şu ana kadar 8000'den fazla polifenolik bileşik izole edilmiş olup, bunun 4000'den fazlasını flavonoidler oluşturmaktadır (Harborne, 1986; Friedli, 2011).

Flavonoidler, fenolik ve piran halkalarından oluşan benzo- $\gamma$ -piran türevleri olup, bitki fenollerinin en geniş sınıfını oluştururlar. Flavonoidlerin temel yapısında 15 karbonlu flavan çekirdeği bulunur. Flavonoidlerin molekül yapıları, aromatik A halkasına birleşik halde bulunan heterosiklik C halkası ve bu C halkasına 2, 3 veya 4 pozisyonundan bağlı ikinci aromatik B halkasından oluşur. Burada bulunan halkalara bağlanabilen farklı fenolik hidroksil grupları buradaki yapıların antioksidan aktivitesinden sorumludur. Farklı türdeki bitkilerde veya aynı bitkinin değişik kısımlarında bulunan flavonoidlerde büyük yapısal farklılıklar vardır.

Diyetteki flavonoidlerin çoğu doğada O-glukozidleri şeklinde bulunur. Bu glukozidik birimler ise genellikle glikozdan ibarettir. Ancak, glukoramnoz, ramnoz, galaktoz, lignin ve arabinoz gibi örnekleri de vardır.

Flavonoidlerin yapısındaki aromatik A ve B halkalarına bağlanan çeşitli fenolik hidroksil grupları (fenolik hidroksiller) flavonoidlerin antioksidan aktivite göstermesini sağlarlar. Aromatik halkalardaki fenolik hidroksil gruplarının farklı şekilde bağlanmaları sonucunda flavonoidler, indirgeyici özellik, hidrojen vericisi, metal şelatlayıcı, singlet oksijeni bastırıcı, süperoksit radikali giderici olarak hareket edebilirler. Bu sayede de lipit peroksidasyonunun engellenmesi, reaktif oksijen çeşitlerini ihtiva eden diğer süreçleri azaltma özellikleri bulunmaktadır. Flavonoidler ayrıca, antioksidan enzimleri aktive ederler,  $\alpha$ -tokoferolden tokoferoksil radikalinin oluşumunu azaltırlar (Procházková ve ark., 2011).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, flavonoidlerin biyolojik aktivitelerinin daha net anlaşılmasını sağlamıştır. Antioksidanlar, insan sağlığına olumlu etkilerini; serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırarak ve antiinflamatuvar etki göstererek ayrıca çeşitli enzimleri daha aktif hale getirerek ya da spesifik reseptörler ile etkileşerek gösterirler. Flavonoidler, ayrıca antiviral, antitrombotik, antialerjik ve vazodilatör etkiler de göstermektedir, ayrıca bakır ve demir benzeri metal iyonları şelatlayabilirler. Flavonoidlerin ateroskleroz, tromboz ve karsinogenez olaylarında önemli etkisi olduğu düşünülen LDL peroksidasyonunu önlediği de literatürde belirtilmektedir (Kahraman ve

ark., 2002; Booyse ve ark., 2007). Kalp ve damar hastalıklarında önleyici ve kansere karşı koruma özelliğine de sahiptirler (Kim ve ark., 2008).

Başlıca flavonoid grupları şunlardır: flavonoller, flavonlar, flavononlar, antosiyaninler ve izoflavonoidler ve antosiyanidinler (flavilyum katyonları), proantosiyanidinler, biflavonoidler ve oligomerik flavonoidler, izoflavonlar (izoflavonoidler), kalkonlar ve auronlar (Friedli, 2011).

### **2.9.2. Fenolik asitler**

Fenolik asitler, sinnamik asit ve benzoik asidin hidroksi türevleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Hidroksibenzoik asitler fenilmetan yapısına sahip, bitki kaynaklı besinlerde genellikle iz miktarda bulunan fenolik asitlerdir. Hidroksisinnamik asitler ise fenilpropan yapısından oluşurlar. Genel olarak; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitler olarak daha yaygındır (Balasundram ve ark., 2006). Hidroksisinnamik asitler doğada diğer forma göre daha fazla bulunurlar. Bitki yapılarında serbest, esterleşmiş ya da glukozidleri halinde bulunan fenolik maddelerin % 30'u, fenolik asit yapısında gıdalar ile alınır (Rossi, 2003; Terpinc ve ark., 2011). Fenolik asitler, sahip oldukları hidroksi ve metoksi gruplarının konumu ve türüne göre değişik isimler alırlar (Cadenas ve Packer, 2002).

Fenolik asitlerin, yapısında bulunan aromatik halkaya bağlanan hidroksil gruplarının sayısına ve konumlarına göre kararlılığı ve antioksidan aktivitesi farklı olmaktadır. Aslında H atomu vererek antioksidan aktivite göstermelerine rağmen, elektron vererek de bu aktivitelerini gösterebilmektedirler. Günümüzde yapılan araştırmalarda fenolik asitlerin; metal şelatlama, hidroksi, peroksil, peroksinitrit ve süperoksit anyon radikallerini süpürmede etkili olduğu tespit edilmiştir (Krimmel ve ark., 2010; Terpinc ve ark., 2011).

### **2.9.3. Fenolik polimerler (Tanenler)**

Fenolik polimer diğer bir deyişle tanen veya proantosiyanidin, molekül ağırlıkları yüksek olan bileşikler olup flavonoidlerin oligomer veya polimer halleridir. Bitkilerin sekonder metabolitleri olup, bu bitkileri zararlılardan korumaya yardım ederler (Aydın ve Üstün, 2007). Fenolik polimerlerin en çok; çileklerde, elmalarda, narda, üzümde ve şaraplarda, üzüm çekirdeklerinde, kakao, çay, tarçın ve ginkgo biloba'da bulunduğu bilinmektedir. Renkleri koyu ve tatları buruk yapıda bir maddedir. Proantosiyanidin içeriği yüksek gıda ya da gıda takviyelerini kısa/uzun süreli kullananlarda ateroskleroz, bazı kanser türleri ve enflamasyonun görülme oranlarının azaldığı bildirilmiştir (Cadenas ve Packer, 2002; Beecher, 2004).

## 2.10. Fabaceae Familyası İle İlgili Yapılan Bazı Antioksidan Çalışmalar

Fabaceae familyası ile ilgili yapılan bazı çalışmalara bakacak olursak; Godevac ve ark. (2008), Sırbistan ve Montenengro'da 9 Fabaceae türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada, araştırdıkları bitki türlerinin test edilen tüm yöntemlerde güçlü antioksidan kapasite sergilediğini bildirmişlerdir.

Pastor-Cavada ve ark. (2009), 15 vahşi *Lathyrus* türünde tohum polifenollerinin antioksidan aktivitesini araştırdığı çalışmalarında bu fenoliklerin, ticari nohut, bakla veya soya fasulyesinden çıkarılan eşdeğer fenoliklere kıyasla iki kattan fazla antioksidan olduğunu belirtmiştir. Bu antioksidan aktivite, ticari nohut, bakla veya soya ile aynı miktarda ekstrakte edilen unlarda gözlemlenenin iki katı gözlenmiştir. Sonuçlar, incelenen *Lathyrus* türlerinin, soya, nohut veya bakla gibi yaygın olarak tüketilen baklagillerin fenoliklerinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerden zengin olduklarını göstermektedir.

Chanda ve ark. (2010), Fabaceae familyasına ait 6 tür üzerinde yaptığı tohum ve meyve kabuğunun antioksidan ve antibakteriyel etkileri ile ilgili çalışmalarında altı bitkinin tümünün meyve kabuğunun tohumlardan daha fazla fenolik bileşik içerdiğini bildirmiştir. Ayrıca *Cajanus indica* Spr.'nin meyve kabuğu özleri yüksek antioksidan özellik göstermiştir ve *Cajanus indica*'nın meyve kabuğunun potansiyel bir antibakteriyel ve antioksidan kaynağı olabileceği belirtilmiştir.

Orhan ve ark. (2011), iki endemik *Genista* türü ile (*Genista vuralii* A. Duran & H. Dural ve *Genista sandrasica* Hartwig & Strid) yaptıkları çalışmada hidrolize ekstraktların daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir; ayrıca *Genista vuralii*'nin, *Genista sandrasica*'ya oranla toplam fenolik ve flavonoid madde ihtivası yönünden daha zengin durumda olduğu tespit edilmiştir.

Gamal-Eldeen ve ark. (2004), *Vicia sativa* L. üzerinde yaptıkları bir çalışmada, farklı radikallere karşı (DPPH, süperoksit anyon ve peroksil) *V. sativa* özütünün güçlü bir antioksidan ve inhibitör aktivite gösterdiği bildirmiştir.

Zengin ve ark. (2015), *Hedysarum varium* Willd., *Onobrychis hypargyrea* Boiss. ve *Vicia truncatula* Fisch. ex M.Bieb. üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bu bitkilerin antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve ayrıca invitro kolinesteraz, tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukosidaz'a karşı inhibisyon potansiyeline sahip olduklarını göstermişlerdir.

Karakoca ve ark. (2013), *Onobrychis armena* Boiss. & A.Huet'nin fenolik bileşikleri, biyolojik ve antioksidan aktivitelerini inceledikleri bir araştırmada, bitkinin çiçek ve kök özütlerinin doğal antimikrobiyal ve antioksidanların potansiyel bir kaynağı

olabileceğini ve gıda endüstrisinde, ilaç keşfinde, klinik ve gıda kimyasında insan ve balık patojenlerine karşı antimikrobiyal ajanlara karşı doğal bir kaynak olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Hayet ve ark. (2008), Tunus'ta yetişen *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel. ile yaptıkları bir çalışmada bitkinin etil asetat, kloroform ve metanol ekstraktlarının; DPPH ve amonyum tiosiyanat yöntemleriyle etkili antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Sharma ve ark. (2011), hint geleneksel tıbbında yaygın olarak kullanılan *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae) kabuğunun metanol ekstraktı ve fraksiyonlarının antioksidan ve DNA koruyucu etkinlik açısından değerlendirdiği çalışmalarında; *B. variegata*'nın fito bileşenlerinin çeşitli serbest radikallerle mücadele etme potansiyeline sahip olduğunu ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyduğunu bildirmişlerdir.

Butkute ve ark. (2016), çok yıllık baklagiller üzerinde yaptıkları bir çalışmada; genel olarak test edilmiş çok yıllık baklagil tohumları ve bitki parçalarının zengin mineral ve biyoaktif maddelere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Trifolium pratense* L., *Trifolium medium* L., *Onobrychis viciifolia* Scop. ve *Astragalus cicer* L.'in toplam fenolik ve antioksidanların değerli bir kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Erbil ve ark. (2015), Fabaceae ailesine (*Vicia villosa* Roth, *Trifolium ochroleucum* Rostk. & Schmidt ve *Onobrychis altissima* Grossh.) ait bazı bitkilerin antimikrobiyal ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada bitkilerin metanolik ekstraktları test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Ayrıca araştırmacılar hayvan yemleri olarak kullanılan *Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* ve *Onobrychis altissima*'nın glutatyon (GSH), toplam antioksidan kapasitesi (TAC) ve toplam fenolik içerik seviyelerini farklı oranda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Beladi ve ark. (2011), *Onobrychis viciifolia*'da “kurşun ve bakırın fitoremediasyonunda antioksidan enzimlerin rolü” ile ilgili çalışmalarında; kurşun ve bakır miktarı arttıkça antioksidan savunmada görevli olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin aktiviteleri ve fonksiyonlarında da önemli bir artış görüldüğünü bildirmişlerdir.

### **2.11. Fabaceae Familyası ve *Onobrychis* Cinsi**

Fabaceae (Leguminosae: Baklagiller), çiçekli bitki sınıfının en büyük üçüncü familyasıdır. Fabaceae familyası tüm dünyada 269 cinse ait 5100 tür ile geniş yayılış gösteren familyalardandır (Mabberley, 1997). Bu familyanın Türkiye florasında, 69 adet

cinsi ve 1000'den fazla türü bulunmaktadır (Davis ve ark., 1988; Seçmen ve ark., 1989). Fabaceae familyasının biyoçeşitliliğinin yanında insan ve hayvan beslenmesi, süs ve tıbbi özelliğe sahip çeşitli türleri bünyesinde bulundurması bakımından da oldukça önemlidir. Bu familyanın önemli bir cinsi olan *Onobrychis* dünyada 342, Türkiye'de ise 42 türle temsil edilmektedir (Aktoklu, 1995, Avcı ve ark., 2010). *Onobrychis* cinsi ilk defa Miller tarafından isimlendirilmiştir. Bundan daha öncesinde ise; Linne (1753) bu cinsin türlerini *Hedysarum* cinsi içinde ele almıştır. Daha sonra ise bu türler *Onobrychis* cinsi içerisine dahil edilmiştir.

*Onobrychis* cinsi tek yıllık veya çok yıllık otsu yapıda olmakla birlikte, nadiren de dikenli yarı çalılardır. Genellikle tabanda odunlaşmış veya kalın toprakaltı gövdelidir. Gövdesi genellikle kıvrık ve belirgin açık yeşil çizgili ve basit tüylü ya da tüysüzdür. Stipülleri (kulakçıklar) serbest veya birleşik olup, genellikle tabandakiler uzun saplı, üsttekiler ise kısa saplı veya nadiren sapsızdır (Akçelik, 2009).

*Onobrychis*, zorlu iklim koşullarına uyum sağlayan bir yem bitkisi olduğu için kireç içeren ve suyun az bulunduğu topraklarda yetiştirilebilecek bir bitkidir. Bu durumdaki verimsiz ve susuz toprakların değerlendirilmesinde ve ekim nöbetinde kullanılabilir. Toprak iyileştirilmesinde önemli bir yeri olan soğuğa dirençli bir bitkidir (Elçi, 2005; Tan ve Sancak, 2009). Tüm bunlara ek olarak; bal özü ve polen bakımından verimli olduğundan arıcılıkta önemli bir konumdadır (Dubbs, 1968).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* Taksonu

Bu tez çalışmasında kullanılan *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* Türkiye florası için endemik bir türdür. Proje kapsamında kullanılan *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* 2015 yılında Konya-Hadim'den toplanmış olup (37° 03' 06'' Kuzey, 32° 29' 27'' Batı) Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA tarafından taksonomik olarak teşhis edilmiştir.

#### 3.2. Bitkisel Ekstraktların Hazırlanması

*Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* Konya-Hadim'den toplanılmış ve gölgede kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin toprak üstü kısımları değirmende toz haline getirilmiştir. Örnekler sokslet aparatında 6-8 saat boyunca metanol ekstraksiyonuna tabii tutulmuştur. Daha sonra ekstrakt Whatman mavi band filtre kağıdında süzölmüş ve çözücüyü uzaklaştırmak için 40 °C'de evapore edilmiştir. Elde edilen kuru maddelerden antioksidan kapasite tayin testleri için çeşitli konsantrasyonlarda etil asetat, su ve metanolik çözeltileri hazırlanmıştır.

Bitkisel materyalin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde tek bir metot bitkinin antioksidan kapasitesini tümüyle yansıtmayacağı için çeşitli metotlar kullanılmıştır. Bu metotlar olarak literatürlerde en sık karşılaşılanlardan: total antioksidan kapasitesi, DPPH metodu, ABTS metodu, demir ve bakır indirgeme gücü metotları uygulanmıştır. Bu metotlara ilaveten ekstraktın toplam flavonoid ve fenolik içerikleri de hesaplanmıştır.

#### 3.3. Antioksidan Kapasite Tayin Testleri

##### 3.3.1. Toplam antioksidan komponentlerin belirlenmesi

##### 3.3.1.1. Toplam fenolik madde tayini

Bitki özütlerinin konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bitkisel özütlerden 250 µl ayrı deney tüplerine alındı. Daha sonra her bir tüpe 1ml Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9 oranında seyreltilmiş) ilave edildi. Ardından her bir tüpe 750 µl %1'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden eklendi. Karışımlar oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbansları ölçüldü. Tüm antioksidan kapasite tayin testlerinde spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de tekrarlandı. Bitkilerin fenolik madde içeriği gallik asit eş değeri (mg GAE/g) olarak verildi (Slinkard ve Singleton, 1977).

### 3.3.1.2. Toplam flavonoid madde tayini

Bitki özütlerindeki toplam flavonoid içerik spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Buna göre %2'lik  $AlCl_3$ 'ün metanolik çözeltisinden 1 ml alınarak aynı hacimde ve 2 mg/ml konsantrasyondaki bitki ekstraktı ile karıştırıldı. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbansı belirlendi. Aynı işlemler standart flavonoid olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi. Sonuçta ekstraktların toplam flavonoid madde içerikleri rutin eş değer (mg RE/g) olarak verildi (Berk ve ark., 2013).

### 3.3.2. Serbest radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi

#### 3.3.2.1. DPPH radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi

Bitkisel özütlerin DPPH radikali süpürme aktivitesi Sarıkürkçü (2011)'e göre yapıldı. Metanolik DPPH çözeltisi %0.004'lük olacak şekilde hazırlandı. Bitkisel özütlerin 1 ml'si hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 ml'si ile karıştırıldı. Tüpler ağızları kapatılıp kuvvetlice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanslar 517 nm'de okundu. Bitkisel özütlerin DPPH radikali süpürme yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Burada;  $A_{\text{kontrol}}$  kontrolün absorbansı ve  $A_{\text{örnek}}$  örneğin absorbansını ifade etmektedir. Aynı işlemler troloks içinde yapıldı ve bitkisel özütlerin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri troloks eş değer olarak verildi (mgTEs/g).

#### 3.3.2.2. ABTS katyon radikal süpürme aktivitesi

Bu metotta  $ABTS^{\cdot+}$  radikal katyonu, 7.4 mM ABTS solüsyonu ile 2.45 mM potasyum persülfatın reaksiyona girmesi ile direkt olarak üretildi. Elde edilen bu karışım 12-16 saat karanlıkta bekletilerek, aktif radikal oluşturması sağlandı. Deneyden önce ABTS solüsyonunun 734 nm'de absorbansı  $0.700 \pm 0.02$  olacak şekilde metanol ile seyreltildi. Bitkisel özütlerden 1 ml alındı ve 2 ml ABTS solüsyonu ile karıştırıldı. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra örneklerin absorbansları 734 nm'de okundu (Re ve ark., 1999). Bitkisel özütlerin ABTS katyon radikalini süpürme yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Burada;  $A_{\text{kontrol}}$  kontrolün absorbansı ve  $A_{\text{örnek}}$  örneğin absorbansını ifade etmektedir. Aynı işlemler troloks içinde yapıldı ve bitkisel özütlerin ABTS katyon radikalini süpürme aktiviteleri troloks eş değer olarak verildi (mgTEs/g).

### 3.3.3. İndirgeme gücünün belirlenmesine yönelik testler

#### 3.3.3.1. FRAP testi

FRAP testinin uygulanmasında öncelikle FRAP reaktifi hazırlandı. FRAP reaktifi, 0.3 M, pH 3.6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl<sub>3</sub>'ün 10:1:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Bitkisel özütlerin 0.1 ml'si hazırlanan FRAP reaktifinin 2 ml'si ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımların absorbansları 593 nm'de okundu. Testin sonuçları troloks eşdeğer olarak değerlendirildi (mgTE/g) (Benzie ve Strain, 1996).

#### 3.3.3.2. CUPRAC testi

Bu test için öncelikle aşağıda belirtilen çözeltiler hazırlandı.

10 mM Cu(II) klorür çözeltisi: CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O'den 0.4262 g tartılarak su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat tamponu: 1 M (pH=7). NH<sub>4</sub>Ac'dan 19.27 g tartılarak su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neokuproin çözeltisi: 7.5 mM, Neokuproin (2,9 dimethyl 1-10 phenantroline)'den 0.039 g tartılarak %96'lık etil alkolle 25 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Metotta bitkisel özütlerden 0.5 ml alındı ve her bir deney tüpüne 1 ml CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 ml amonyum asetat ile 1 ml neokuproin çözeltileri eklendi. Tüpler ağzları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm'de okundu. Testin sonuçları troloks eşdeğer (mgTE/g) olarak yorumlandı (Apak ve ark., 2006).

### 3.3.4. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi

#### 3.3.4.1. Fosfomolibdat testi

Metotta kullanılacak reaktif çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlandı:

0.6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi: 0.83175 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alınır ve 24.18825 ml saf su üzerine sızdırılarak ilave edildi.

28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O çözeltisi: 0.025 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O tartılıp hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlandı.

4 mM Amonyum molibdat çözeltisi: 0.123585 gr amonyum molibdat tartılıp hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlandı.

Bu şekilde hazırlanan çözeltiler bir mezürde karıştırılarak reaktif çözeltisi hazırlandı. 2 mg/ml konsantrasyonunda bitkisel çözeltilerden 0.3 ml bir tüpe alındı ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden 3 ml eklendi. Tüpler kuvvetlice karıştırılıp 95 °C'de

90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorbanı 695 nm'de okundu. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan troloks için de yapıldı. Antioksidan aktivite troloks eşdeğeri (mgTE/g) olarak hesaplandı (Prieto ve ark., 1999).

### 3.3.5. Metal şelatlama aktivitesi

Örneklerin  $Fe^{2+}$  iyonlarını şelatlama kapasiteleri Dinis ve ark. (1994) yöntemine göre belirlendi. İçerisinde 2 ml bitkisel özüt (2 mg/ml) bulunan deney tüplerine 2 mM 0.05 ml  $FeCl_2$  çözeltisi ilave edildi. Tepkime 0.2 ml 5 mM ferrozin ilavesiyle başlatıldı. Tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 562 nm'de absorban ölçümü yapıldı. Aynı işlemler şelatlayıcı ajan olan EDTA içinde yapıldı. Ferrozin- $Fe^{2+}$  oluşum inhibisyonu (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı ve deney sonuçları EDTA eş değeri olarak değerlendirildi (mg EDTA/g).

$$\text{Metal şelatlama kapasitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Antioksidan Kapasite Metotlarına Ait Sonuçlar

Bu tez çalışmasında *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın etil asetat, metanol ve su özütlerinin antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Buna ilave olarak toplam içerdikleri fenolik ve flavonoid madde miktarları da belirlenmiştir.

#### 4.1.1. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği

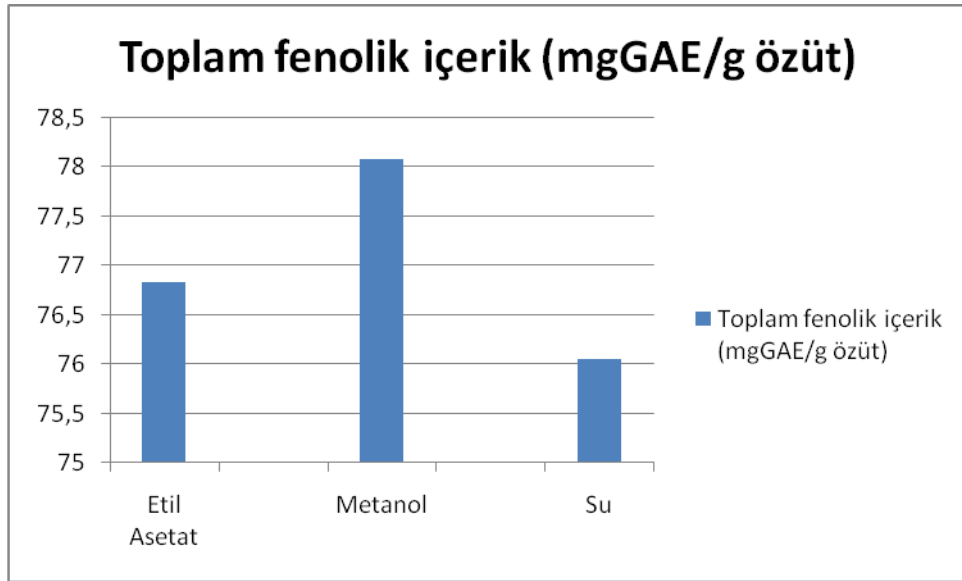
Fenolik bileşikler; sağlık üzerine olan olumlu etkileri ve sahip oldukları önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle bilim dünyasının dikkatini çekmiştir. Bitkilerin toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar günden güne artmaktadır. Bitkimizin toplam fenolik içeriğini belirlemek için basit ve sıkça kullanılan Folin metodu kullanılmıştır. Folin metodunda bitkilerdeki fenolik maddelerin miktarı standart bir fenolik maddenin kullanılması ve elde edilen sonucun onun eş değeri olarak verilmesi esasına dayanır. Bu çalışmamızdaki Folin yönteminde standart olarak gallik asit kullanıldı. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın etil asetat, metanol ve su özütlerinin toplam fenolik, flavonoid içerikleri ve toplam antioksidan kapasiteleri Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın toplam fenolik, flavonoid içerikleri ve toplam antioksidan kapasiteleri

Özütler	Toplam fenolik içerik (mgGAE/g özüt)	Toplam flavonoid içerik (mgRE/g özüt)	Toplam antioksidan kapasite (mmolTE/g özüt)
Etil asetat	76.83±0.56*	32.56±0.24	2.04±0.11
Metanol	78.09±2.17	41.57±0.17	2.11±0.19
Su	76.06±0.39	22.70±0.17	1.63±0.08

\*Ortalama±Standart Sapma. GAE: Gallik asit eşdeğeri; RE: Rutin eşdeğeri; TE: Troloks eşdeğeri

Sonuçlara bakıldığında özütlerin fenolik içeriklerinin birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Çalışmamızdan çıkan sonuçlara göre; fenolik içerik bakımından en zengin özüt metanol özütüdür (Şekil 1.). Metanol özütünde 78.09 mgGAE/g fenolik bileşik bulunmuştur. Metanol özütünden sonra fenolik içerik miktarını etil asetat (76.83 mgGAE/g) ve su özütü (76.06 mgGAE/g) takip etmektedir.

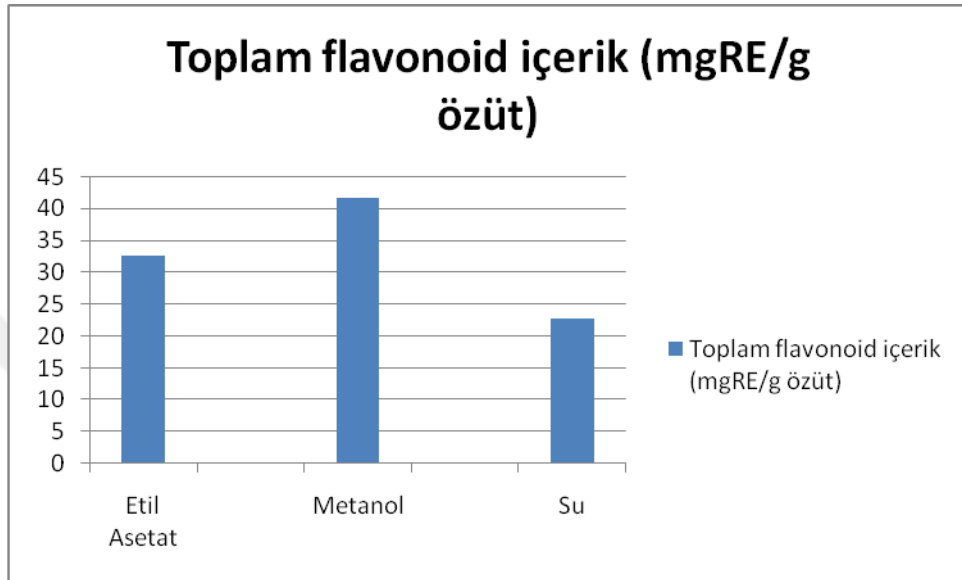


Şekil 1. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin toplam fenolik içeriği

Karataş (2013), *Onobrychis armena*'da toplam fenolik madde miktarını araştırdığı çalışmasında; özütler arasında fenolik içeriği en fazla metanol özütünde gözlemlemiştir. Metanol özütünde 62.199 mgGAE/g fenolik madde bulmuştur. Metanol özütünü içerik bakımından su ve etil asetatın takip ettiğini bildirmiştir. Godevac ve ark. (2008)'de Fabaceae familyasına ait dokuz tür üzerinde yaptıkları çalışmada; *Onobrychis scardica* (Griseb.) Halácsy'nın toplam fenolik madde miktarını 115.23mg GAE/g olarak bulmuşlardır ki bu miktar *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın içerdiği fenolik madde miktarından daha fazladır. Bununla birlikte yine aynı çalışmada; *Astragalus glycyphyllos* L. (44.6 mgGAE/g) ve *Coronilla emerus* L. (38 mgGAE/g) özütleri ise *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'dan daha düşük fenolik madde içeriğine sahiplerdir. Aynı çalışmada en yüksek fenolik içerik *Lathyrus binatus* Pancic, özütünde 180.88 mgGAE/g olarak rapor edilmiştir. Karakoca ve ark. (2013), *Onobrychis armena*'nın fenolik bileşikleri, biyolojik ve antioksidan aktivitelerini inceledikleri bir araştırmada, toplam fenolik içeriği çiçek ve kök metanol özütlerinde sırasıyla 87.32 mg GAE/g ve 128.23 mg GAE/g olarak bulmuşlardır. Butkute ve ark. (2016), çok yıllık baklagiller üzerinde yaptıkları bir çalışmada, *Trifolium* cinsinin ve *Onobrychis viciifolia*'nın bitki parçalarının, *Astragalus* ve *Medicago* türlerinden daha fazla fenolik içerdiğini bildirmişlerdir. *Onobrychis hypargyrea*'nın fenolik içeriğinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise etil asetat özütünde; 83.25 mg GAE/g, metanol özütünde; 73.20 mg GAE/g, su özütünde ise; 69.38 mg GAE/g fenolik içerik tespit edilmiştir (Zengin ve ark., 2015). Fabaceae familyasına ait *Genista vuralii* ve *Genista sandrasica*'nın antioksidan özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada da *Genista* türlerinin fenolik

içeriklerinin (*G. vuralii*: 212.24 mgGAE/g; *G. sandrasica*: 166.94 mgGAE/g) oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Orhan ve ark., 2011).

Fenolik bileşiklerin en geniş ve önemli grubunu oluşturan flavonoidlerin toplam içeriği rutin eşdeğeri olarak verilmiştir. Flavonoid içerik olarak en zengin özüt 41.57 mgRE/g içerik ile metanol özütüdür. Bunu etil asetat (32.56 mgRE/g) ve su özütü (22.70 mgRE/g) takip etmektedir (Tablo 1., Şekil 2.).



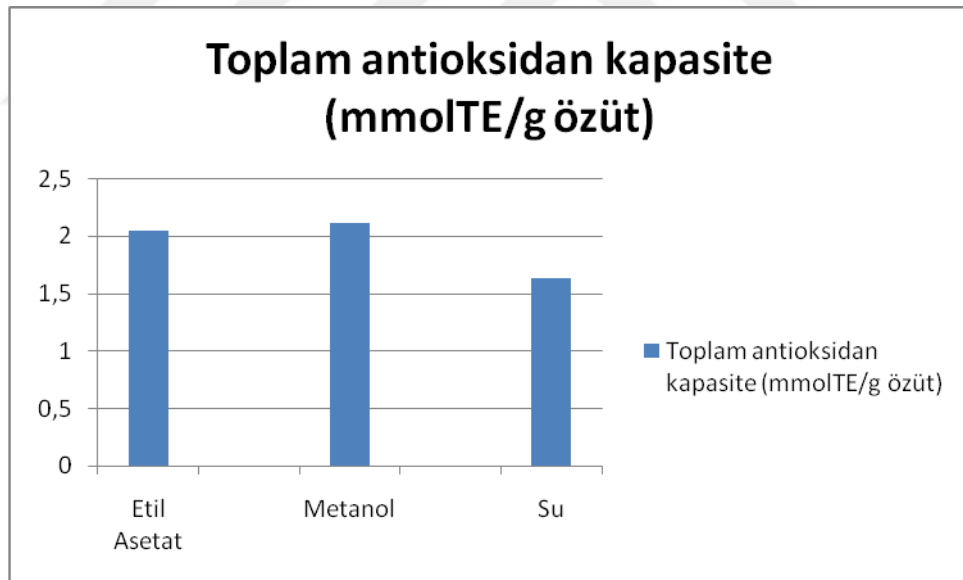
Şekil 2. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin toplam flavonoid içeriği

Sharma ve ark. (2011) hint geleneksel tıbbında yaygın olarak kullanılan *Bauhinia variegata* (Fabaceae) kabuğunun metanol özütü ile yaptıkları çalışmada flavonoid miktarını metanol özütünde 937.5 mg RE/g olarak bulmuşlardır. Hayet ve ark. (2008) Tunus'ta yetişen *Retama raetam* üzerinde yaptıkları bir çalışmada bitkinin etil asetat ve metanol ekstraktlarının flavonoid içeriğini sırası ile 53.81mg CAE/g ve 41.58 mg CAE/g olarak bildirmişlerdir. Karakoca ve ark. (2013) *Onobrychis armena*'nın fenolik bileşikleri, biyolojik ve antioksidan aktivitelerini inceledikleri bir araştırmada, bitkinin çiçeklerinden elde edilen metanol özütlerinde flavonoid miktarını 23.92 mg QE/g, köklerinden elde edilen metanol özütlerinde ise; 2.26 mg QE/g olarak bulmuşlardır. Zengin ve ark. (2015) bazı Fabaceae türleri (*Hedysarum varium*, *Onobrychis hypargyrea*, *Vicia truncatula*) üzerinde yaptıkları bir çalışmada, *Onobrychis hypargyrea*'nın toplam flavonoid içeriğini; metanol özütünde, 27.00 mg RE/g, su özütünde 25.20 mg RE/g ve etil asetat özütünde ise; 9.92 mg RE/g, olarak bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre; *Onobrychis argyrea* subsp.

*isaurica*'nın toplam flavonoid içeriği metanol ve etil asetat özütlerinde *Onobrychis hypargyrea*'dan daha fazladır.

#### 4.1.2. Toplam antioksidan kapasite (Fosfomolibdat testi)

*Onobrychis argyrea subsp. isaurica*'nın toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde fosfomolibdat testi kullanılmıştır (Tablo 1.). Fosfomolibdat testi, antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde uygulanan testlerden en yaygın kullanılanlardan birisidir. Fosfomolibdat testi, asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo(VI)'yi, Mo(V)'e indirgemesine ve ortaya çıkan fosfat/Mo(V) bileşiğinin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır. Bu metot ile sonuç verirken; antioksidan aktivitesini bildiğimiz bir maddeye göre eşdeğeri olarak verilir. Genel olarak bilinen standart antioksidan madde olarak troloks ya da askorbik asidi kullanılır. Bu çalışmada fosfomolibdat aktivitesi troloks eşdeğer olarak değerlendirilmiştir. Etil asetat, metanol ve su özütlerinden en yüksek aktivite; 2.11 mmolTE/g ile metanol özütüdür. Bunu sırası ile etil asetat; 2.04 mmolTE/g ve su özütü; 1.63 mmolTE/g olarak takip etmektedir (Tablo 1., Şekil 3.).



Şekil 3. *Onobrychis argyrea subsp. isaurica* özütlerinin toplam antioksidan kapasitesi

Ince ve ark. (2012) *Onobrychis viciifolia* bitkisinin antioksidan etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında; fosfomolibdat metodu ile antioksidan kapasitesini (askorbik asit eşdeğeri olarak); aseton özütünde  $1918.78 \pm 18.70 \mu\text{mol/g}$  özüt, metanol özütünde  $1739.50 \pm 17.11 \mu\text{mol/g}$  özüt, etil asetat özütünde  $1375.63 \pm 8.13 \mu\text{mol/g}$  özüt, su özütünde ise;  $521.85 \pm 5.33 \mu\text{mol/g}$  özüt olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak bu

araştırcılar tarafından fosfomolibdat testi için, çalışılan özütlede antioksidan kapasiteler aseton > metanol > etil asetat > su özütü şeklinde tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında aseton özütü kullanılmamış ve yukarıdaki sonuçlara benzer şekilde antioksidan kapasiteler metanol > etil asetat > su özütü şeklinde bulunmuştur.

#### 4.1.3. ABTS ve DPPH giderme etkinliği

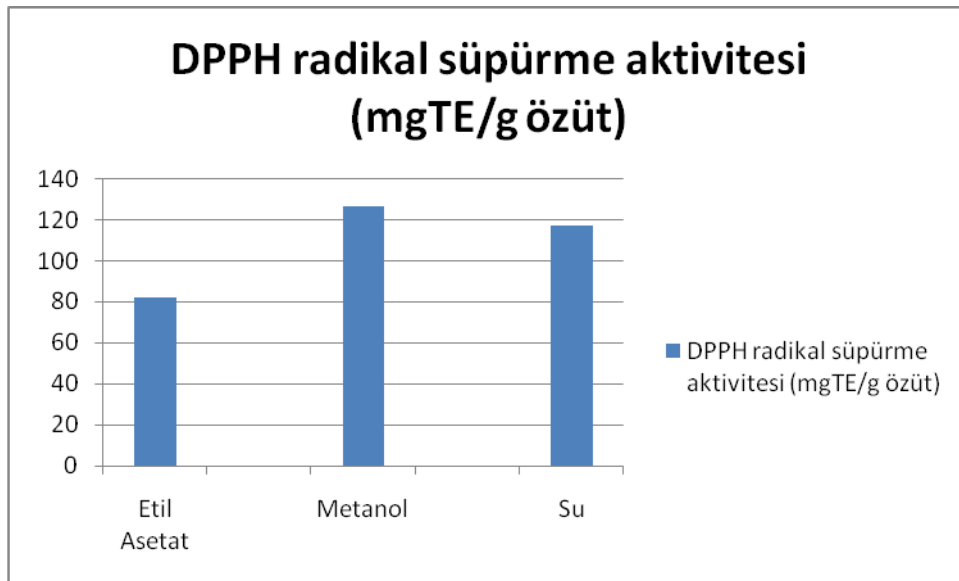
ABTS ve DPPH radikalleri nispeten kararlı yapılarıdır. Bu nedenle antioksidan testlerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu tez çalışmasında *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin serbest radikal giderim/süpürüm aktiviteleri DPPH ve ABTS radikalleri kullanılarak belirlenmiştir. Kararlı bir radikal olan DPPH, antioksidan kapasite tayininde en sık kullanılan radikaldir. Antioksidanlarla reaksiyona giren DPPH elektron alır ve renk açılması gerçekteşir ve bu nedenle absorbansta düşme meydana gelir. Eklenen madde DPPH çözeltilsinin renginin açılmasını sağlarsa absorban değeri düşük olarak ölçülür ve düşük olarak tespit edilen absorban ise aktivitenin yüksek olduğu anlamına gelir. Sonuçlar Tablo 2.'de verilmiştir.

Tablo 2. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin DPPH ve ABTS radikali süpürme etkinliği

Özütler	DPPH radikal süpürme aktivitesi (mgTE/g özüt)	ABTS radikal süpürme aktivitesi (mgTE/g özüt)
Etil asetat	81.81±0.76*	429.35±2.38
Metanol	126.51±0.21	522.95±0.43
Su	116.89±0.87	543.93±0.50

\*Ortalama±Standart Sapma. TE: Troloks eşdeğeri

Çalışılan *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütleri DPPH radikal süpürme etkinliği açısından değerlendirildiğinde; en kuvvetli etki metanol özütünde (126.51 mgTE/g) tespit edilmiştir. Bunu sırası ile su (116.89 mgTE/g) ve etil asetat (81.81 mgTE/g) özütleri takip etmektedir (şekil 4.).

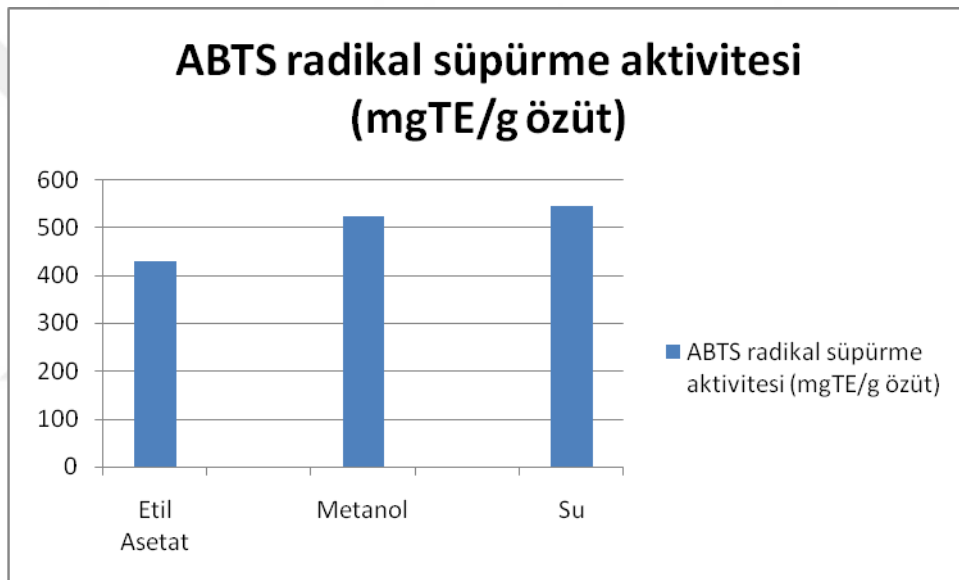


Şekil 4. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin DPPH aktivitesi

Aliyazıcıoğlu ve ark. (2017), *Onobrychis oxyodonta* Boiss. metanolik özütünü DPPH yöntemiyle incelediği çalışmalarında; IC<sub>50</sub> değeri 1.333±0.0026 mg/mL olarak bulmuşlardır. Standart olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ile karşılaştırıldığında IC<sub>50</sub> değerinin BHT'ye göre daha yüksek çıktığını tespit etmişlerdir. Temizer ve ark. (2017), *Onobrychis* Mill. polenlerinin antioksidan aktivitesini inceledikleri bir çalışmalarında numunenin ve standardın DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi SC<sub>50</sub> (µg/mL) olarak; BHA (8.77 ± 0.29) < *Onobrychis*, Pollen (10.55 ± 0.57) < alfa tocopherol (11.42 ± 0.74) bulmuşlardır. Karamian ve Asadbegy (2016), İran bölgesinde bulunan üç *Onobrychis* türü üzerinde yaptıkları çalışmalarında; özütlerin DPPH süpürme aktivitelerini ise; *O. viciifolia* (IC<sub>50</sub>; 0.113 ± 0.002 mg / ml) > *O. sosnowskyi* Grossh. (IC<sub>50</sub>; 0.121 ± 0.005 mg / ml) ≥ *O. melanotricha* Boiss. (IC<sub>50</sub>; 0.129 ± 0.001 mg / ml) > askorbik asit (IC<sub>50</sub>; 0.143 ± 0.007 mg / ml) olarak tespit edilmiştir. Godevac ve ark. (2008), *Onobrychis scardica*'nın metanol özütünde DPPH aktivitesini 52.31±2.13 IC<sub>50</sub> (µg/ml) olarak bulmuşlardır. Karakoca ve ark. (2013), *Onobrychis armena*'nın çiçek ve kök özütlerindeki antioksidan kapasitenin belirlenmesine yönelik çalışmalarında DPPH yönteminde çiçek, metanol ve etanol ekstraktları, sırasıyla, % 94.21 (IC<sub>50</sub> 669.23 µg / mL) ve % 45.15 (IC<sub>50</sub> > 1000 µg / mL) en yüksek DPPH aktivitelerini göstermiştir. Kök özütlerinde ise metanol ve etanol ekstraktları sırasıyla % 91.14 (IC<sub>50</sub> 515.52 µg / mL) ve % 87.89 (IC<sub>50</sub> 950.32 µg / mL) en yüksek DPPH temizleme aktivitelerini göstermiştir. Ince ve ark. (2012) *O. viciifolia* bitkisinin hava kısımlarındaki DPPH aktivitesini inceledikleri çalışmalarında; metanol ekstraktının su

ekstraktına kıyasla daha yüksek radikal süpürme özelliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde, DPPH testinde metanol özütünün diğer özütlerle kıyasla en fazla antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur. Zengin ve ark. (2015), *Onobrychis hypargyrea*'nın antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında; DPPH aktivitesini etil asetat özütünde;  $0.31 \pm 0.003$  IC<sub>50</sub> (mg/mL) metanol özütünde;  $0.29 \pm 0.002$  IC<sub>50</sub> (mg/mL) su özütünde ise;  $0.27 \pm 0.001$  IC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak bulmuşlardır.

Bu tez çalışmasında, ABTS radikali süpürme bakımından incelenen özütlerde ise en kuvvetli etki su özütünde (543.93 mgTE/g) gözlenmiştir. Bunu sırası ile metanol özütü (522.95 mgTE/g) ve etil asetat özütü (429.35 mgTE/g) takip etmektedir (Şekil 5.).



Şekil 5. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin ABTS aktivitesi

DPPH ve ABTS radikali süpürme bakımından en düşük özüt her iki yöntemde de etil asetat özütü olmuştur. Godevac ve ark. (2008) *Onobrychis scardica*'nın metanol özütünde ABTS aktivitesini  $17.39 \pm 0.40$  IC<sub>50</sub> (µg/ml) olarak tespit etmişlerdir. Zengin ve ark. (2015), *Onobrychis hypargyrea*'nın antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında; ABTS radikali süpürme aktivitesini; metanol özütünde;  $1.27 \pm 0.007$  IC<sub>50</sub> (mg/mL), su özütünde;  $1.22 \pm 0.014$  IC<sub>50</sub> (mg/mL), etil asetat özütünde ise;  $1.20 \pm 0.007$  IC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak bulmuşlardır.

#### 4.1.4. Demir ve bakır indirgeme gücü

İndirgeme gücü veya potansiyeli antioksidan kapasitenin en önemli belirteçlerinden biridir. Bu potansiyel antioksidan aktivitesi araştırılan bileşikler veya

özütlerin elektron verme yeteneğini göstermektedir. Bu indirgeme gücü, fenolik yapıdaki antioksidan maddelerin önemli bir mekanizmasıdır. Bu amaçla bu çalışmada, indirgeme gücünün tespit edilmesi amacıyla; FRAP ve CUPRAC testleri kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıda Tablo 3.'de gösterilmektedir.

Tablo 3. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin FRAP, CUPRAC ve metal şelatlama aktiviteleri

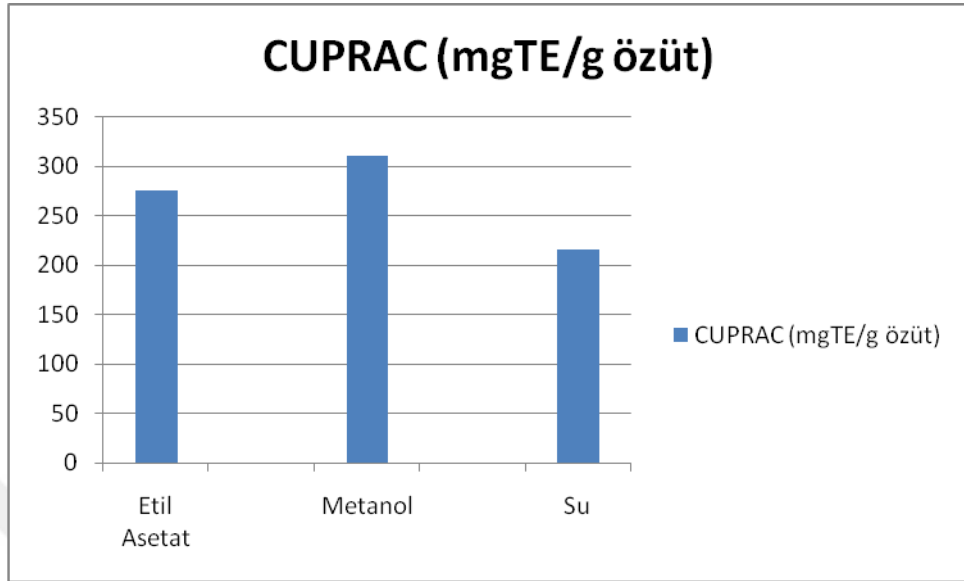
Özütler	CUPRAC (mgTE/g özüt)	FRAP (mgTE/g özüt)	Metal şelatlama aktivitesi (mgEDTAE/g özüt)
Etil asetat	276.27±5.44*	179.19±3.51	10.54±0.38
Metanol	311.36±5.17	200.70±2.33	7.75±0.11
Su	216.06±0.87	187.45±2.57	19.41±0.08

\*Ortalama±Standart Sapma. TE: Troloks eşdeğeri; EDTAE: EDTA eşdeğeri.

Bakır indirgeme gücünün tespit edilmesi amacıyla kullanılan CUPRAC metodu; bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu(II)-Nc) kullanılarak polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin tayini için geliştirilen spektrofotometrik bir yöntemdir, antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)- neokuproin kompleksinin renkli Cu(I)-Nc şelatına indirgenmesi ve bu şelatın maksimum ışığı soğurduğu 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Apak ve ark., 2004; Özyürek ve ark., 2011). CUPRAC yöntemi bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden öncelikle gıda maddelerinde bulunan polifenoller, C ve E vitamini gibi antioksidanların tayininde daha sonra ise insan serumunda TAC belirlenmesinde, hidroksil radikal süpürücü maddeler üzerinde kullanılmıştır (Apak ve ark., 2005; Bektaşoğlu ve ark., 2008). Daha sonra proteinlerin, kolay yükseltgenebilen bazı amino asit gruplarının, özellikle tiyol içeren proteinlerin de TAC üzerine katkısının belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiştir (Demirci Çekiç ve ark., 2009). Demir indirgeme gücünün tespiti için kullanılan FRAP yönteminde ise, demir (III) tripridiltriazin ( $Fe^{3+}$  -TPTZ) kompleksi antioksidan vasıtasıyla düşük pH ortamında demir (II) tripridiltriazin ( $Fe^{2+}$  -TPTZ) kompleksine indirgenir. Meydana gelen  $Fe^{2+}$  -TPTZ kompleksinin rengi kuvvetli mavidir ve 593 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Düşük pH (pH:3,6)'larda demirin indirgenmesi demirli tripridiltriazin kompleksinin oluşmasına neden olur (Benzie ve Strain, 1996; Kara, 2011).

Bu çalışmada *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin CUPRAC sonuçlarına bakıldığında en yüksek aktivite metanol özütünde 311.36 mgTE/g olarak

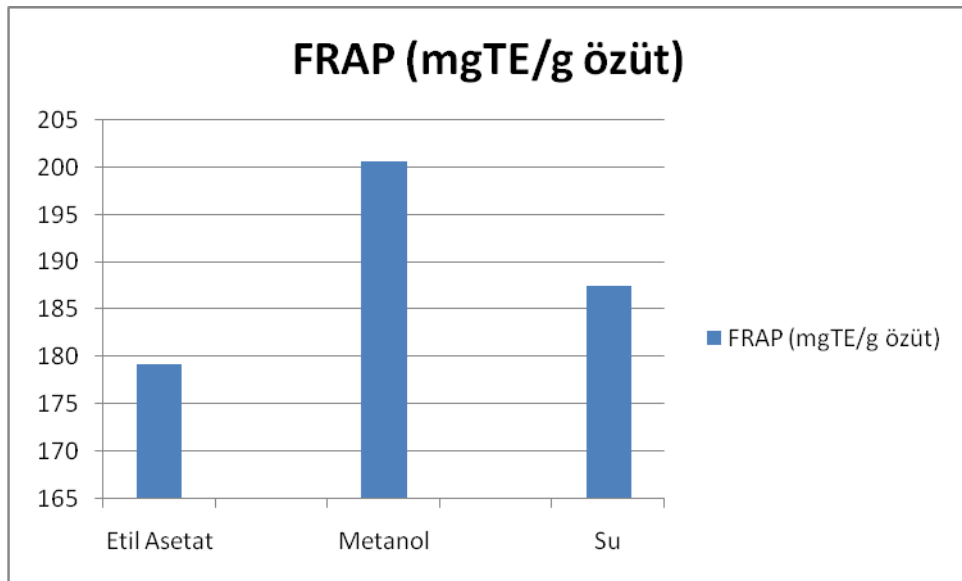
tespit edilmiştir. Bunu sırası ile etil asetat 276.27 mgTE/g ve su özütü 216.06 mgTE/g takip etmektedir (Şekil 6.).



Şekil 6. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin CUPRAC aktivitesi

Zengin ve ark. (2015), *Onobrychis hypargyrea*'nın antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında; CUPRAC sonuçlarını; metanol özütünde;  $0.89 \pm 0.056$  EC<sub>50</sub> (mg/mL), etil asetat özütünde;  $0.81 \pm 0.021$  EC<sub>50</sub> (mg/mL), su özütünde ise;  $0.80 \pm 0.011$  EC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak bulmuşlardır. Karakoca ve ark. (2013), *Onobrychis armena*'nın çiçek ve kök özütlerinde antioksidan kapasitenin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmalarında, bu tez çalışmasındaki sonuçlara benzer şekilde CUPRAC aktivitesini metanol özütünde su özütüne kıyasla daha yüksek tespit etmiştir.

FRAP test sonuçlarına bakıldığında; 200.70 mgTE/g ile en yüksek sonuç metanol özütünde bulunmuştur. Bunu su özütü 187.45 mgTE/g ve etil asetat özütü 179.19 mgTE/g takip etmektedir (Şekil 7.).



Şekil 7. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin FRAP aktivitesi

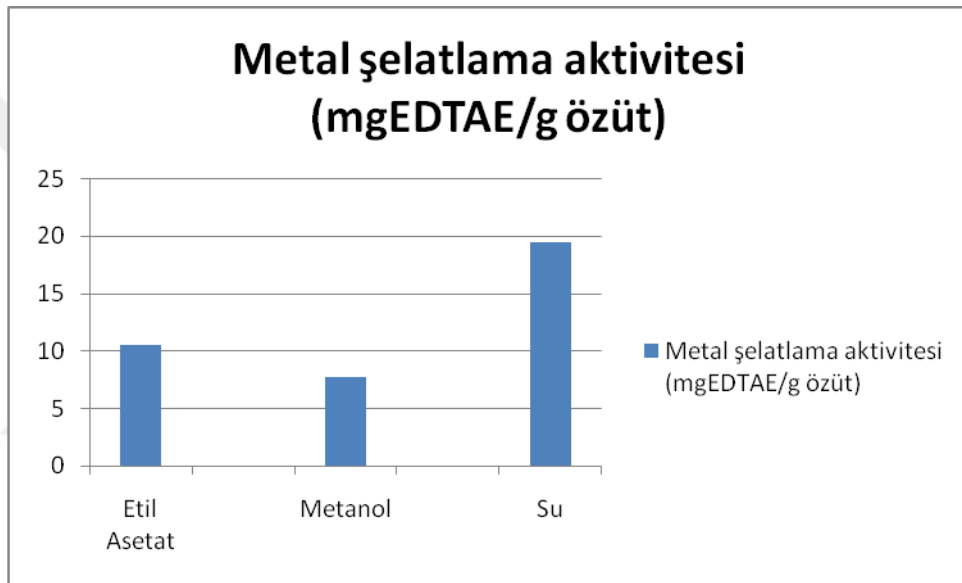
Aliyazıcıoğlu ve ark. (2017), *Onobrychis oxyodonta* metanolik özütünün FRAP değerini  $323 \pm 5.773 \mu\text{M}$  Troloks/g özüt olarak bulmuşlardır. Karakoca ve ark. (2013), *Onobrychis armena*'nın çiçek ve kök özütlerinde antioksidan kapasitenin belirlenmesine yönelik çalışmalarında FRAP yönteminde  $1000 \mu\text{g} / \text{mL}$  konsantrasyonda en güçlü aktiviteyi, metanol kök ekstraktında ( $A_{700\text{nm}} 0.84$ ) tespit ederken, su çiçek özütünde ise ( $A_{700\text{nm}} 0.08$ ), en düşük aktivite tespit edilmiştir. *Onobrychis armena*'nın kök özütünün, çiçek özütünden daha iyi demir iyonu indirgeme kabiliyetine sahip olduğunu belirtmişlerdir. *O. armena*'nın çiçek özütlerinde FRAP aktivitesi metanol > diklormetan > etanol > su > hekzan şeklinde, kök özütlerinde ise metanol > diklormetan > etanol > hekzan > su şeklinde belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da, çalışılan özütlerde FRAP aktivitesi metanol özütünde su özütüne kıyasla daha yüksek seviyede tespit edilmiştir. Zengin ve ark. (2015), *Onobrychis hypargyrea*'nın antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında; FRAP test sonuçlarını; metanol özütünde;  $0.39 \pm 0.003 \text{ EC}_{50} (\text{mg/mL})$ , su özütünde;  $0.37 \pm 0.004 \text{ EC}_{50} (\text{mg/mL})$ , etil asetat özütünde ise;  $0.34 \pm 0.005 \text{ EC}_{50} (\text{mg/mL})$  olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde metanol özütlerinin FRAP aktivitesin diğer özütlere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.1.5. Metal şelatlama aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesinin önemli olmasının nedeni; lipit peroksidasyonuna neden olan metalleri tutuklamasıdır (Duh ve ark., 1999). Fenton kimyasından da bilindiği üzere antioksidan aktivite açısından  $\text{OH}\cdot$  radikallerinin ortaya çıkmasına neden

olan  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+}$  gibi metallerin tutulmasında önemli bir rolü vardır. Bu sebeplerden dolayı, şelat yapabilme özelliğinde olan bileşikler organizmada geçiş metallerini bağlayarak, radikal oluşmasını engeller. Bu etkilerinden dolayı serbest radikallerin meydana getirdikleri zararların önlenmesinde işlev görürler. Çalışmamız kapsamında değerlendirilen *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin metal şelatlama kapasiteleri ferrozin metodu kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.).

Test sonuçlarına göre en yüksek aktivite 19.41 mgEDTAE/g ile su özütünde tespit edilmiştir. Etil asetat özütünde 10.54 mgEDTAE/g, metanol özütünde ise 7.75 mgEDTAE/g olarak bulunmuştur (Şekil 8.).



Şekil 8. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin metal şelatlama aktivitesi

Temizer ve ark. (2017), *Onobrychis* Mill. polenlerinin antioksidan aktivitesini inceledikleri çalışmalarında metal şelatlama aktivitesini Dinis metoduyla incelemişler ve; 100  $\mu g$  / mL konsantrasyonda örneklem standartlarının metal şelat aktivitelerinin *Onobrychis* polen (% 89.43  $\pm$  1.74) >  $\alpha$ -tocopherol (% 82.97  $\pm$  0.41) > BHA (% 76.36  $\pm$  1.39) olduğu bulmuşlardır. Karamian ve Asadbegy (2016), İran bölgesinde bulunan üç *Onobrychis* türü (*O. viciifolia*, *O. melanotria*, *O. sosnovskyi*) üzerinde yaptıkları çalışmalarında; araştırılan tüm metanol özütlerin  $Fe^{2+}$  iyonlarını şelatlama aktivitesinin olduğunu görmüşlerdir. Özütlerin metal şelatlama özelliği konsantrasyona (0.2 ila 0.1 mg / ml) bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. *O. viciifolia* metal şelatlama aktivitesi ile sentetik bir antioksidan olan askorbik asit arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. *O. melanotria*'dan ve *O. sosnovskyi*'den elde edilen özütler, *O. viciifolia*'ya kıyasla önemli

ölçüde daha fazla şelatlama aktivitesi göstermiştir. Zengin ve ark. (2015), *Onobrychis hypargyrea*'nın antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında; metal şelatlama aktivitesini metanol özütünde;  $47.27 \pm 1.255$  IC<sub>50</sub> (mg/mL) su özütünde ise;  $16.79 \pm 0.456$  IC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak bulmuşlardır.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın metanol, su ve etil asetat özütlerinin antioksidan kapasitesi, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri araştırılmıştır.

Antioksidan kapasite belirleme çalışmalarında tek bir yöntem kullanılması antioksidan kapasitenin doğru bir şekilde değerlendirilmesinde yeterli olmamaktadır. Bu nedenle antioksidan kapasitenin belirlenmesinde birden fazla test sistemi kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda; toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde fosfomolibdat testi ve metal şelatlama aktivitesinin değerlendirilmesi kullanılmıştır. Özütlerinin serbest radikal giderim/süpürüm aktiviteleri ise; DPPH ve ABTS radikalleri kullanılarak belirlenmiştir. İndirgeme gücü veya potansiyeli antioksidan kapasitenin en önemli belirteçlerinden biridir. Çalışmamızda indirgeme gücünün tayininde ise; FRAP ve CUPRAC testleri uygulanmıştır. Ayrıca her bir özütün toplam fenolik ve flavonoid içerikleri belirlenmiştir. Çünkü fenolik bileşikler bitkilerde antioksidan kapasiteyi etkileyen en önemli fitokimyasal gruptur.

*Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'da toplam fenolik ve flavonoid içerik ile toplam antioksidan kapasite genel olarak metanol özütünde, etil asetat ve su özütlerine göre daha yüksek tespit edilmiştir. Toplam antioksidan kapasitesini araştırdığımız fosfomolibdat testi sonuçlarına bakıldığında en yüksek aktivite metanol özütünde gözlenmiştir; bunu etil asetat ve su özütü takip etmektedir. Çalışmamızda özütlerin serbest radikal giderim/süpürüm aktiviteleri DPPH ve ABTS radikalleri kullanılarak belirlenmiştir. DPPH yönteminde en kuvvetli etki metanol özütünde gözlemlenmiştir. ABTS radikali süpürme bakımından incelenen özütlerde ise en kuvvetli etki su özütünde gözlemlenmiştir. Bu çalışmamızda *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın indirgeme gücünü tespit etmek amacıyla FRAP ve CUPRAC testleri kullanılmıştır. FRAP yönteminde en yüksek sonuç metanol özütünde bulunmuştur; bunu sırası ile su ve etil asetat özütü takip etmektedir. CUPRAC sonuçlarına bakıldığında ise; en yüksek aktivite metanol özütünde tespit edilmiştir, bunu sırası ile etil asetat ve su özütü takip etmektedir. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin metal şelatlama kapasiteleri ferrozin metodu kullanılarak değerlendirilmiştir ve en yüksek aktivite su özütünde tespit edilmiştir, bunu sırası ile etil asetat ve metanol özütleri takip etmektedir.

## 5.2. Öneriler

Vücutta oksijen kullanımı sonucunda meydana gelen atık ürün olan serbest radikaller; biyolojik sistemlerin işleyişini bozan etki göstermektedir. Özellikle DNA hasarları meydana getirmesi ve hücre zarlarına zarar verici özellikler göstermektedirler. Sürekli bir şekilde serbest radikal türlerinin etkisi altında olan biyolojik sistemlerin yenilenebilmesi için antioksidan moleküller gereklidir. Bazı antioksidan türlerini vücut kendisi üretmektedir ancak diğer bir kısmının ise doğadan besinler yoluyla alınması gerekmektedir. Günümüzde sentetik bileşiklerin insan sağlığı üzerindeki kaygılarından ötürü doğal bileşikler daha da önemli bir konuma gelmişlerdir. Doğal bileşiklerin bu önemli durumundan dolayı yeni, doğal ve güvenli kaynakların bulunması için yapılan çalışmalar artmıştır. Ayrıca bitkilerden yeni ve potansiyel doğal bileşiklerin kaynaklarının belirlenmesi çalışmaları oldukça hız kazanmıştır. *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica*'nın antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar dikkate alındığında bu türün özütlerinin doğal antioksidanların bir kaynağı olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bununla birlikte *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* özütlerinin biyolojik aktivitelerinin tam olarak belirlenmesi için daha geniş çalışmaların yapılması gerekmektedir. Çalışmamızı bu açıdan değerlendirdiğimizde, bu tür üzerine yapılabilecek diğer araştırmalara yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akçelik, E., 2009, Bazı yabancı korunga (*Onobrychis sp.*) türlerinin kromozom sayılarının tespit ve karyotip analizi, Yüksek lisans tezi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Mimoza yayınları*, Kuzucular ofset, Konya.
- Aktoklu, E., 1995, Türkiye’de yetişen *Onobrychis* Miller. (*Fabaceae*) türlerinin revizyonu, Doktora Tezi, *İnönü Üniversitesi*, Malatya.
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., 2010, Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (4), 401-409.
- Aliyazıcıoğlu, R., Akkaya, Ş., Korkmaz, N., Şener, S.Ö., Badem, M., Özgen, U., Alpay-Karaoğlu, Ş., 2017, *Onobrychis Oxydonta*’nın topraküstü kısmında antioksidan, antimikrobiyal ve tirozinaz inhibitör aktivitesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg.*, 31 (1), 25-31.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., Ercağ, E., 2006, The cupricion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbalteas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 292-304.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. ve Altun M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)- neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39, 949-961.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Aslan, R., Şekeroğlu, R., Bayıroğlu, F., 1995, Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, *YYÜ Sağ. Bil. Ens. Derg.*, 2, 137-142.
- Avcı, S., Çöçü, S., Sancak, C., Özcan, S., 2010, *Heliobrychis* seksiyonuna ait bazı korunga (*onobrychis sp.*) türleri üzerinde morfolojik araştırmalar, *Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 19 (1-2), 11-16.
- Aydın, S. S., Üstün, F., 2007, Tanenler 1: Kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33, 21-31.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Bast, A., Haenen, G.M., Cees, J.A.D. 1997, Oxidants and antioxidants: state of the art., *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 3-13.

- Baytop, A., 1988, İstanbul eczacılık fakültesi herbaryumundaki türkiye bitkileri, İstanbul, s. 60-61.
- Becker, E. M., Nissen, L. S., Skibsted, L. H., 2004, Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects, *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.
- Beecher, G. R., 2004, Proanthocyanidins: biological activities associated with human health, *Pharmaceutical Biology*, 42, 2-20.
- Bektaşoğlu, B., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2008, Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC, *Talanta*, 77, 90-97.
- Beladi M., Habibi D., Kashani A., Paknejad F., Nooralvandi T., 2011, Phytoremediation of lead and copper by sainfoin (*Onobrychis vicifolia*): Role of antioxidant enzymes and biochemical biomarkers, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 10 (3), 440-449.
- Benzie, I. F. F. and 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.
- Berk, S., Tepe, B., Arslan, S., Sarikurkcu, C., 2013, Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of asplenium ceterach DC, *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8902-8908.
- Beşkaya, A., 2004, Broylerlerde doğal ve sentetik antioksidanların bazı iz elementler üzerine etkisi, *Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara.
- Booyse, F. M., Pan, W., Grenett, H. E., Parks, D. A., Darley-Usmar, V. M., Bradley, K. M., Tabengwa, E. M., 2007, Mechanism by which alcohol and wine polyphenols affect coronary heart disease risk, *Annals of Epidemiology*, 17, S24-S31.
- Bouaziz, M., Feki, I., Ayadi, M., Jemai, H., Sayadi, S., 2010, Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 894-905.
- Bowler R.P, Crapo J.D., 2002, Oxidative stres in allergic respiratory diseases, *J. Allergy Clin Immunol.*, 110(3), 349-356.
- Butkutė B., Lemežienė N., Dagilytė A., Cesevičienė J., Benetis R., Mikaliūnienė J., Rodovičius H., 2016, Mineral element and total phenolic composition and antioxidant capacity of seeds and aerial plant parts of perennial legumes. *Communications in soil science and plant analysis*, 47, 36-45.
- Bülbül, M. ve Erat, M., 2008, Investigation of the effects of some sulfonamide derivates on the activities of glucose-6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from human erythrocytes, *JEIMC.*, 23(3), 418-423.

- Cadenas, E., 1997, Basic mechanisms of antioxidant activity, *Biofactors*, 6, 391-397.
- Cadenas, E. ve Packer, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Revised and Expanded, 2<sup>nd</sup> Ed., Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- Carocho, M. ve Ferreira, I. C. F. R., 2013, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Chanda S., Dudhatra S., Kaneria M., 2010, Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruitrind of nutraceutical plants belonging to the Fabaceae family. *Food&Function*, 1, 308-315.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R., 1999, Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- Cheeseman, KH. ve Slater, TF., 1993, An introduction to radical biochemistry, *Br. Med. Bull.*, 49, 481-493.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Zanden, J., Bladeren, P.J., 2001, The inter play of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Envorimental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141-152.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., 1997, Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, *Helvetica Chimica, Acta*, 4, 1144 – 1152.
- Çakır, M., 1997, Aspirin ve vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)'nin farelerde (*Mus musculus*) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri Yüksek Lisans tezi, *Ondokuz Mayıs Üniv., Fen Bil. Ens.*, Samsun.
- Çavdar, C., Sifil, A. ve Çamsarı, T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon*, 3-4, 92-95.
- Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Pençe, S., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001, Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo, *Clinical Biochemistry*, 34, 297-302.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., 1988, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 10 (Suppl. 1), *Edinburgh University Press*, Edinburgh.
- Demirci Çekiç, S., Sözgen Başkan, K., Tütem, E., Apak, R., 2009, Modified cupric reducing antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols, *Talanta*, 79, 344-351.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M., 1994, Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid-peroxidation and as peroxy radical scavengers, *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 161-169.

- Du, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R., 2012, Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of the cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826, 443-457.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G., 2006, Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*, *Food Chem.*, 95, 37-43.
- Duarte, T. L. ve Lunec, J., 2005, Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C, *Free Radical Research*, 39, 671- 686.
- Dubbs A.L. 1968, Sainfoin as a honey crop, Sainfoin symposium, *Montana State University*, December 12-13. Bozeman, Montana.
- Duh, P.D., Tu, Y.Y., Yen, G.C., 1999, Antioxidant activity of harng jyr (*Cheysatheumum morifolium* Ramat), *Lebnesm-Wiss Technol*, 32, 269-277.
- Durmaz, G., 2002, Kayısı meyvesinin ve kavrulmuş kayısı çekirdeğinin antioksidan özellikleri, Yüksek lisans tezi, *İnönü Üni.*, *Fen Bil. Ens.*, Malatya.
- EFSA, 2004, Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ), *European Food Safety Authority Journal*, 84, 1-50.
- EFSA, 2011, Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive, *European Food Safety Authority Journal*, 9, 2392. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2392.
- EFSA, 2012, Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene – BHT (E 321) as a food additive, *European Food Safety Authority Journal*, 10, 2588. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2588.
- Elçi Ş. 2005, Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri, *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı yayını*, 486s.
- Erat, M., 2002, İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması, Doktora tezi, *A.Ü.*, *Fen Bil. Ens.*, Erzurum.
- Erbil, N., Düzgüner, V., Kahya, C. D., Alan, Y., 2015, Antimicrobial and antioxidant effects of some turkish fodder plants belongs to fabaceae family (*Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* and *Onobrychis altissima*). *Oriental Journal of Chemistry*, 31, 1263-1268.
- Erenel, G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A., 1992, Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Derg.*, 3. 243-250.

- Eryılmaz, B., 2001, *Capsicum annuum* (L.) Solanaceae meyvelerinin antioksidan aktivite açısından değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniv.* 102 s, Ankara.
- Foo, L., Lu, Y., Molan, A., L., Woodfield, D., R., McNabb, W., C., 2000, The phenols and prodelphinidins of white clover flowers, *Phytochemistry*, 54, 539-548.
- Friedli, G. L., 2011, Flavonoids [online], <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html> [Ziyaret Tarihi: 18 Kasım 2012].
- Fridovich I., 1995, Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., Kirkman, H.N., 1989, Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes, *Blood*, 73 (1), 334-339.
- Gamal-Eldeen A. M., Kawashty S. A., Ibrahim L. F., Shabana M. M., El- Negoumy S. I., 2004, Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive properties of aerial parts of *Vicia sativa* and its flavonoids, *Journal of Natural Remedies*, 4, 81-96.
- Gey, K. F., 1990, Lipids, lipoproteins and antioxidants, *Biochemical Society Transactions*, 18, 1041-1045.
- Godevac D., Zdunic G., Savikin K., Vajs V., Menkovic N. 2008, Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro, *Fitoterapia*, 79, 185-187.
- Gonçalves, C., Dinis, T., Batista, M.T., 2005, Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for antiinflammatory activity, *Phytochemistry*, 66, 89-98.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006, Algal antioksidanlar, *E.U.Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 23, 85-89.
- Gruhlke, M. C. H., Slusarenko, A. J., 2012, The biology of reactive sulfur species (RSS), *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 98-107.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E., 2006, *Biyokimya*, Birinci Baskı, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 975-420-462-4.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1995, The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 125-126.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C., 1999, Free radicals in biology and medicine, Third Edition, *Oxford University Pres. Inc.*, New York, 936.

- Halliwell, B., 2006, Reactive species and antioxidants, redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Halliwell, B., 2007, Biochemistry of oxidative stress, *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147–1150.
- Harborne, J. B., 1986, In: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B., Alan, R.,(eds), *Plant flavonoids in biology and medicine*, Liss, New York.
- Harris, E.D., 1992, Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.*, 6, 2675-2683.
- Hayet E., Maha M., Samia A., Mata M., Gros P., Raida H., Ali MM., Mohammed AS., Gutmann L., Mighri Z., Mahjoub A. 2008, Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia, *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2933–2940.
- Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervick, B., Williamson, G., 1997, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class theta glutathione transferase T2-2, *Biochem. Soc. Trans.*, 25, 559-561.
- Ince, S, Ekici, H, Yurdakok, B., 2012, Determination of in vitro antioxidant activity of the sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extracts, *Ank. Univ. Vet. Fak. Derg.*, 59, 23-27.
- Jensen, S. J. K., 2003, Oxidative stress and free radicals, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 666–667, 387–392.
- Jialal, I., Fuller, C. J., 1993, Oxidized LDL and Antioxidants, *Clin. Cardiol.*, 16(4), 16-19.
- Kahraman, T., 1998, Elektrik alanın rat eritrosit ve dokularındaki antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz) aktiviteleri, lipit peroksidasyon ve glutatyon seviyelerine etkisi (doktora tezi), *Y.Y.Ü Sağ. Bil. Ens.*, Van.
- Kahraman, A., Serteser, M., Köken, T., 2002, Flavonoidler, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3, 1-8.
- Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Yokuyama, H., Masumara, T., Tanaka, K., 1999, Molecular cloning and characterization of cDNA for an iron- superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 302-308.
- Kara, N., 2011, Serumda toplam antioksidan kapasitenin modifiye cuprac (bakır(II) indirgeme esaslı antioksidan kapasite) metoduyla belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, *İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Karagözler, A.A., Erdağ, B., Emek, Y.Ç., Uygun, D.A., 2008, Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400- 407.
- Karakoca K., Asan-Özüsağlam M., Çakmak Y. S., Teksen M., 2013, Phenolic compounds, biological and antioxidant activities of *Onobrychis armena* Boiss. & Huet flower and root extracts, *Chiang Mai J. Sci.*, 42(2), 376-392.

- Karamian R, Asadbegy M., 2016, Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three *Onobrychis* species from Iran, *Pharm Sci.*, 22, 112-119.
- Karataş, Ş., 2013, *Onobrychis armena* Boiss. & Huet (Fabaceae) ‘nın antioksidan özellikleri ile uçucu ve sabit yağ bileşiminin araştırılması, *Selçuk Üniversitesi, Yüksek lisans tezi*, Konya.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004, Biyokimya, *Aktif yayınevi*, Erzurum.
- Kenneth, B.B., Bruce, N.A., 1998, The free radical theory of aging matures, *Physiol Reviews*, 78(2), 547-581.
- Keser, G., 2005, *Nasturtium officinale* R. Br.’de Kurşunun strese bağlı enzimlerin aktivitelerine, gelişmeye, mineral ve klorofil içeriğine etkileri, Doktora tezi. Ç.Ü., *Fen Bil. Ens.*, Adana.
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., Quinn, M. T., 2007, Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 1749–1770.
- Kılınç, K., 1986, Oxygen radicals: Their production, function and toxic effects, *Biyokimya Dergisi*, 9(3), 59-76.
- Kim, D., Lee, J. T., Lee, I. K., Ha, J., 2008, Comparative anticancer effects of flavonoids and diazepam in cultured cancer cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 255-259.
- Krimmel, B., Swoboda, F., Solar, S., Reznicek, G., 2010, OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – A gamma radiolysis study, *Radiation Physics and Chemistry*, 79, 1247–1254.
- Laganier, S., Yu, B.P., 1989, Effect of chronic food restriction in ageing rats II. liver cytosolic antioxidants and related enzymes, *Mech of Age and Develop*, 48, 221-230.
- Lala, P.K., Chakraborty, C., 2001, Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression, *The Lancet Oncology*, 2, 149-156.
- Lamotte, F., Vianey-Liuaud, N., Duviau, M.P., Korehel, K., 2000, Glutathione reductase in wheat grain, 1. Isolation and characterization, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4978-4983.
- Lardinnois, O.M., 1995, Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide, *Free Radic. Res.*, 22, 251-274.
- Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Houlst, J. R. S., 1989, Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin, *Biochemical Pharmacology*, 38, 2859-2865.
- Mabberley D.J., 1997, The plant book, *Cambridge University Press*, London, UK.

- Mannervick, B., 1985, Glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, 113:490-495.
- McCord, J.M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance, *Clin. Biochem.*, 26 (5), 351-357.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994, Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, 17(3), 235-248.
- Mullineaux, P., Enard, C., Hellens, R., Creissen, G., 1996, Characterization of glutathione reductase gene and its genetic locus from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 200, 186-194.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000, Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed., *Worth Publishers*, USA. 743.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M., 2004, Lehninger Principles of Biochemistry, 4<sup>th</sup> Ed., *W.H. Freeman and Company*, New York, 978-0716743392.
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2000, Enzymology and Structure of Catalases, *Advances in Inorganic Chemistry*, 51, 51-106.
- Nordberg, J., Arner, E.S., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Orhan I., Tosun F., Tamer U., Duran A., Alan B., Kok A.F., 2011, Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(1), 35-42.
- Özdem, S. ve Şadan, G., 1994, Serbest oksijen radikallerinin oluşum ve klinik açıdan önemi, *A Ü, Tıp Fak. Derg.*, 11 (1), 63-71.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (4), 652-664.
- Paolini, M., Pozetti, L., Pedulli, G. F., Marchesi, E., 1999, The nature of prooxidant activity of vitamin C, *Life Sciences*, 64, 273-278.
- Papas, A.M. 1996, Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, (31), 77-82.
- Pastor-Cavado E., Juan R., Pastor J.E., Alaiz M., Vioque., 2009, Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain, *LWT*, 42, 705-709.
- Perl-Treves, R., Perl, A., 2002, Molecular Oxygen and Its Reactive Derivates, Oxidative Stres in Plants, *Taylor & Francis Inc.*, London, 1-31.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.

- Prochazkova, D., Bousova, I., Wilhelmova, N., 2011, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Puglia, C. D., Powell, S. R., 1984, Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury, *Environmental Health Perspectives*, 57, 307-11.
- Ratnam, V.D, Ankola, D.D., Bhardwaj, D.K., Sahana, M.N.V., Ravi, K., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Control Release* 113, 189-207.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology And Medicine*, 26, 1231-1237, (1999).
- Reddy, S. V., Suchitra, M. M., Reddy, Y. M., Reddy, P. E., 2010, Beneficial and detrimental actions of free radicals: a review, *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 3-11.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Rossi, R. J., 2003, Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- Sarikurkcu, C., 2011, Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. Tubers and leaves, *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 831-839.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G., Bekat, L., 1989, Tohumlu bitkiler sistematigi, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kitaplar Serisi*, 116.
- Sharma N., Bhardwaj R., Kumar S., Kaur S., 2011, Evaluation of *Bauhinia variegata* L. bark fractions for in vitro antioxidant potential and protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to pBR322 DNA, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(12), 1494-1500.
- Siems, W.G., Grune, T., Esterbauer, H., 1995, 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine, *Life Sciences*, 57, 785-789.
- Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996, Oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 83-106.
- Slinkard, K., Singleton, V. L., 1997, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55, (1977).
- Sreekumar, P., Brian, C., Steven, B., 2006, Nordihydroguaiaretic acid (NDGA): A powerful antioxidant and anti-inflammatory ingredient for skin care applications, *Flavour and Fragrance Journal*, 34, 61-64.
- Stahl, W., Sies, H., 2002, Introduction: Reactive oxygen species, *Research Monographs*, 7, 1-2.

- Strong, R., Miller, R. A., Astle, C. M., Floyd, R. A., Flurkey, K., Hensley, K. L., Javors, M. A., Leeuwenburgh, C., Nelson, J. F., Ongini, E., Nadon, N. L., Warner, H. R., Harrison, D. E., 2008, Nordihydroguaiaretic acid and aspirin increase lifespan of genetically heterogeneous male mice, *Aging Cell*, 7, 641-650.
- Tan M., Sancak C. 2009, Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) *Yem Bitkileri Cilt 2*, R. Avcioğlu, R. Hatipoğlu, Y. Karadağ (editörler), Sayfa, 337-352, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü Yayınları*, İzmir.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A., Grisham, M. B., 2004, Methods for detection of reactive metabolites of reactive oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286, R431-R444.
- Temizer, İ.K., Güder, A., Turkmen, Z., Celemlı, Ö.G., 2017, Gas chromatography and mass spectrometry analysis, chemical contents and antioxidant properties of *Onobrychis spp.* (Fabaceae) polen collected by honeybees, *Fresenius Environmental Bulletin*, 26-No. 1a/, 962-968.
- Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsy, A., Ulrich, N., P., Abramovic, H., 2011, Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids, *Food Chemistry*, 128, 62-69.
- Thomas, R.H., Bernardis, M.A., Drake, E.E., Guglielmo G.C., 2010, Changes in the antioxidant activities of seven herb and spice-based marinating sauces after cooking, *Journal of Food Composite and Analysis*, 23, 244-252.
- Thurnham, D.I., 1990, Antioxidants and prooxidants in malnourished populations, *Proceedings Nutr. Society*, 49, 247-259.
- Tsao, R., 2010, Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Türk Gıda Kodeksi, 2008, *Renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkı maddeleri tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ*, Tebliğ No:2008/69, <http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2008-22.html> [Ziyaret Tarihi: 16 Kasım 2012].
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.D., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, Review, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.

- Vince, P., 1999, Antioxidant potential of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 746-761.
- Wickens, A.P., 2001, Ageing and free radical theory, *Respiration Physiology*, 128, 379-391.
- Wohaieb, S.A., Godin, D.V., 1987, Starvation related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats, *Diabetes*, 36, 169-173.
- Yanbeyi, S., 1999, Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri, Doktora tezi, *Ondokuz Mayıs Üniv.*
- Yıldırım, A., 2003, İntakt ve adrenaletomili sıçanların eritrosit ve mide dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması, *Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum.*
- Yüksek, T., Sarıyıldız, T., Tüfekçioğlu, A. ve Kalay, H. Z., 2002, Korunga (*Onobrychis viciifolia Scop.*) bitkisinin Gümüşhane tarım ve hayvancılığı açısından irdelenmesi, Gümüşhane ve yöresinin kalkınması sempozyumu, *Bildiriler Kitabı*, Cilt 2, 616-626, 23-25 Ekim, Gümüşhane.
- Zengin, G., Guler, G.O., Aktumsek, A., Ceylan, R., Nancy Picot, C. M., and Mahomoodally M. F., 2015, Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey, *Advances in Pharmacological Sciences*, Article ID 410675, 8 pages.
- Zurita, J.L., Jos, A., Peso, A., Salguero, M., López-Artíguez, M., Repetto, G., 2007, Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems, *Water Research*, 41, 2599 – 2611.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Fırat KARADAĞ  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Tarsus 21.04.1989  
**Telefon** : 05530937379  
**Faks** :  
**e-mail** : firatkaradagfirat@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Tarsus Sağlık Meslek Lisesi, Tarsus, Mersin	2007
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Konya	2013
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya	
Doktora	:	

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009	Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Biyolog

### UZMANLIK ALANI

### YABANCI DİLLER

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

### YAYINLAR