İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİOKSİDANLARIN REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TÜKETİMİYLE CUPRAC ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Aydan ÇETİNKAYA
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Ocak, 2013

İSTANBUL



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİOKSİDANLARIN REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TÜKETİMİYLE CUPRAC ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Aydan ÇETİNKAYA
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Ocak, 2013

İSTANBUL

Bu çalışma 07/02/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof.Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Esma TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 24283 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım süresince danışmanım olarak, her zaman beni yönlendiren, her konuda desteğini gördüğüm, bilgisini, tecrübesini benden esirgemeyen değerli hocam *Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ' e*

Tez çalışmam sırasında daima yol gösteren, deneyim ve bilgisini paylaşan değerli hocalarım *Sayın Prof. Dr. Reşat APAK, Prof. Dr. Hayati FİLİK, Prof. Dr. Esma TÜTEM* ve *Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN 'a,*

Çalışmalarım süresince her türlü laboratuar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı' na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma,

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, yüksek lisans öğrenimim süresince gösterdikleri destek ve yardımlarından dolayı sevgili arkadaşlarım *Gamze ÇETİNTAŞ*, *Şener SAĞLAM*, *Aslı Neslihan AVAN* ve *Aslı DEMİR*'e

Gönüllü olarak tez çalışmam için kan veren değerli arkadaşım *Olcay ÇETİN*' e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan 24283 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ocak, 2013 **Aydan ÇETİNKAYA**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİL LİSTESİ vi
TABLO LİSTESİ vii
SEMBOL LİSTESİ viii
ÖZET x
SUMMARY xi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL KISIMLAR 4
2.1. SERBEST RADİKALLER ve OKSİDATİF STRES 4
2.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS) 5
2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$) 7
2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 7
2.2.3. Hidroksil Radikali (OH•) 7
2.2.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$) 9
2.2.5. Hidroperoksil Radikali (HO_2•) 9
2.2.6. Hipokloröz Asit (HOCl) 9
2.3. ANTİOKSİDANLAR 9
2.4. KAN 12
2.5. SERUMDA BULUNAN KÜÇÜK MOLEKÜLLÜ ANTİOKSİDANLAR 13
2.5.1. Glutatyon (GSH) 13
2.5.2. Ürik Asit 14
2.5.3. Bilirubin 15
2.6. SERBEST RADİKAL TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER 15
2.6.1. N,N-Dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) Yöntemi 15

2.6.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi 16

2.6.3. Hidroksil Radikali Süpürme Yöntemi 18

2.6.4. Süperoksit Radikali Süpürme Yöntemi 18

2.7. ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ 18

2.7.1. HAT – Hidrojen Atomu Transferi Esasına Dayanan Yöntemler 19

*2.7.1.1. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi **19***

*2.7.1.2. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi **19***

2.7.2. ET- Elektron Transferi Esasına Dayanan Yöntemler 20

2.7.2.1. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ ABTS Yöntemi 20

*2.7.2.2. Folin Ciocalteu (FC) Yöntemi **21***

*2.7.2.3. DPPH (2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil)Yöntemi **21***

*2.7.2.4. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi **21***

*2.7.2.5. FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi **22***

3. MALZEME VE YÖNTEM 23

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR 23

3.2. KİMYASAL MADDELER 23

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER 24

3.3.1. Antioksidan Çözeltileri 24

*3.3.1.1. Fenolik Antioksidan Çözeltileri **24***

*3.3.1.2. Sistein Çözeltisi **24***

*3.3.1.3. Glutatyon Çözeltisi **24***

*3.3.1.4. Askorbik Asit Çözeltisi **24***

*3.3.1.5. Ürik Asit Çözeltisi **24***

3.3.2. CUPRAC Reaktif Çözeltileri 24

*3.3.2.1. $CuCl_2.2H_2O$ Çözeltisi **24***

*3.3.2.2. Neokuproin Çözeltisi **25***

*3.3.2.3. Amonyum Asetat Çözeltisi **25***

3.3.2.4. pH 7 Üreli Tampon ***25***

3.3.3. ABTS Reaktif Çözeltileri **25**

3.3.3.1. ABTS / Persülfat Çözeltisi ***25***

3.3.3.2. PBS (Phosfate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi ***25***

3.3.4. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Yöntemi (TBARS) Çözeltileri ..**25**

3.3.4.1. pH 7,0 Fosfat Tamponu ***25***

3.3.4.2. 2-Deoksi-D-Riboz Çözeltisi ***25***

3.3.4.3. Na_2EDTA Çözeltisi ***26***

3.3.4.4. Amonyum Demir (II) Sülfat ($(NH_4)_2Fe(SO_4).6H_2O$) Çözeltisi ***26***

3.3.4.5. H_2O_2 Çözeltisi ***26***

3.3.4.6. Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi ***26***

3.3.4.7. 2-Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi ***26***

3.3.5. N,N-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi Çözeltileri **26**

3.3.5.1. Demir (III) Klorür ($FeCl_3$) Çözeltisi *26*

3.3.5.2. pH 5,7 Asetat Tamponu ***26***

3.3.5.3. H_2O_2 Çözeltisi ***26***

3.3.5.4. N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DMPD) Çözeltisi ***26***

3.4. SERUM ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI **26**

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER **27**

3.5.1. CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi **27**

3.5.2. ABTS/Persülfat Yöntemi **27**

3.5.3. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi **28**

3.5.4. N,N-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi **28**

3.5.4.1. N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yönteminin Optimizasyonu ***28***

3.5.5. Seçilen Bireysel Antioksidan Bileşiklere Kullanılan Dört Yöntemin Cevapları **29**

3.5.6. Sentetik Karışımların Toplam Antioksidan Kapasiteleri ve ROS Süpürme Aktivitelerinin İncelenmesi 30

3.5.7. Seçilen Serum Antioksidanlarının Tek Başlarına ve Serum Örneği Varlığında Toplamsallıklarının İncelenmesi 31

3.5.8. İnsan Serumuna TAC ve TOC Yöntemlerinin Uygulanması 31

4. BULGULAR 32

4.1. N,N-DİMETİL-*p*-FENİLENDİAMİN (DMPD) YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU 32

4.1.1. pH Denemesi 32

4.1.2. Zaman Denemesi 32

4.1.3. Demir (III) Miktarının Belirlenmesi 33

4.1.4. H_2O_2 Miktarı Denemesi 34

4.2. SEÇİLEN BİREYSEL ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE KULLANILAN DÖRT YÖNTEMİN CEVAPLARI 34

4.3. SENTETİK KARIŞIMLARIN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE ROS SÜPÜRME AKTİVİTELERİ 41

4.4. İNSAN SERUMUNA TAC ve TOC YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI 43

4.4.1. Serum Seyreltme Oranlarının Sonuçları 43

4.4.2. Seçilen Serum Antioksidanlarının Tek Başlarına Ve Serum Örneği Varlığında Toplamsallıklarının İncelenmesi 44

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 47

6. KAYNAKLAR 50

ÖZGEÇMİŞ 56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Antioksidanların sınıflandırılması 10
Şekil 2.2 : Kandan plazma eldesi, kan ve plazma oranları 12
Şekil 2.3 : Glutatyonun Yapısı 13
Şekil 2.4 : Ürik Asitin Yapısı 14
Şekil 2.5 : Bilirubinin Yapısı 15
Şekil 2.6 : 2- Deoksi -D- Riboz 17
Şekil 2.7 : TBA_2-MDA oluşum reaksiyonu 17
Şekil 2.8 : $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun yapısı 20
Şekil 2.9 : CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu 22
Şekil 4.1 : Kafeik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 35
Şekil 4.2 : Troloks için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 35
Şekil 4.3 : Rutin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 36
Şekil 4.4 : Epikateşin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 36
Şekil 4.5 : *p*-Kumarik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 37
Şekil 4.6 : Kuersetin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 37
Şekil 4.7 : Naringin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 38
Şekil 4.8 : Kateşin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 38
Şekil 4.9 : Sistein için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 39
Şekil 4.10 : Askorbik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 39
Şekil 4.11 : Glutatyon için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 40
Şekil 4.12 : Ürik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans ($mol.L^{-1}$) eğrileri 40

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 **:** pH denemelerinin süpürücü yokluğunda ve varlığındaki absorbansları 32
Tablo 4.2 **:** DMPD yönteminde 1saat boyunca absorbans değişimi 33
Tablo 4.3 **:** Demir (III) miktarının referans absorbansına etkisi 33
Tablo 4.4 **:** H_2O_2 miktarının referans absorbansına etkisi 34
Tablo 4.5 **:** İkili Karışımların CUPRAC Yöntemi Sonuçları..... 41
Tablo 4.6 **:** İkili Karışımların ABTS/persülfat Yöntemi Sonuçları..... 42
Tablo 4.7 **:** İkili Karışımların DMPD Yöntemi Sonuçları..... 42
Tablo 4.8 **:** İkili KarışımlarınTBARS Yöntemi Sonuçları 43
Tablo 4.9 **:** Dört yöntem üzerinde serumun seyrelme etkisi..... 43
Tablo 4.10 **:** CUPRAC yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı..... 44
Tablo 4.11 **:** ABTS yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı45
Tablo 4.12 **:** DMPD yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı 45
Tablo 4.13 **:** TBARS yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı 46

SEMBOL LİSTESİ

DNA	: deoksiribonükleik asit
ATP	: adenozin trifosfat
TR	: troloks
QR	: kuersetin
CAT	: kateşin
EC	: epikateşin
CFA	: kafeik asit
NG	: naringin
***p*-Cum**	: para kumarik asit
RT	: rutin
TEAC	: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
AA	: askorbik asit
GSH	: indirgenmiş glutatyon
ÜA	: ürik asit
CYS	: sistein
EGCG	: epigallokateşingallat
AOx	: antioksidan
TAC	: toplam antioksidan kapasite
TOC	: toplam oksidatif dönüşüm
MDA	: malondialdehit
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat)
TBARS	: tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
DMPD	: N,N-dimetil-p-fenilendiamin
CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini
TBA	: tiyobarbitürik asit
TCA	: trikloroasetik asit
Nc	: neokuproin
K_2HPO_4	: potasyum hidrojen fosfat
KH_2PO_4	: potasyum dihidrojen fosfat
EDTA	: etilen diamin tetra asetik asit
COOH	: karboksil grubu
H_2O_2	: hidrojen peroksit
ROS	: reaktif oksijen türleri
O_2	: moleküler oksijen
$^1O_2$	: singlet oksijen
$O_2^{\cdot -}$	: süperoksit radikali
OH·	: hidroksil radikali
$HO_2^{\cdot}$	: hidroperoksil radikali
HOCl	: hipokloröz asit
R·	: karbon merkezli radikal
ROO·	: peroksil radikali

RO·	: alkoksil radikali
L	: lipid
L·	: lipid radikali
LOO·	: lipid peroksil radikali
LOOH	: lipid hidroperoksit
SOD	: süperoksit dismutaz
GSH-Px	: glutatyon peroksidaz
HAT	: hidrojen atomu transferi
ET	: elektron transferi
AAPH	: 2,2' azobis(2-amidinopropan)dihidroklorür
TRAP	: toplam radikal tutma parametresi
ORAC	: oksijen radikal absorbans kapasitesi
PE	: β- fikoeritrin
FC	: folin ciocalteu
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	: demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
TPTZ	: tripridiltriazin

ÖZET

ANTİOKSİDANLARIN REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TÜKETİMİYLE CUPRAC ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Oksijen yaşam için gereklidir, ancak vücut üzerinde zararlı etkileri de vardır. Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içersinde süperoksit, singlet oksijen, hidroksil radikali vb. reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Reaktif oksijen türleri sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir. Bu nedenle, antioksidanların radikal süpürme aktivitelerinin ölçümü büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada Fe(II)-H_2O_2 ve Fe(III)-H_2O_2 reaksiyonuyla Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşturuldu. Aynı ortama eklenen sentetik antioksidanların bu ROS'ları süpürme aktiviteleri Tiyobarbütirik asit reaktif maddeler (TBARS) ve N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yöntemleri ile tayin edildi ve böylece "Toplam Oksidatif Dönüşüm (TOC)" (TOC, Total Oxidative Conversion) belirlendi. Kullanılan antioksidanların toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) de bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (ABTS/TEAC) yöntemleri kullanılarak ölçüldü. Yöntem önce sentetik karışımlara daha sonra serum gibi gerçek bir biyolojik sıvıya uygulandı.

Yapılan denemeler sonucunda CUPRAC ve ABTS/perülfat (referans ile örnek arasındaki fark ABTS'nin absorbansı olarak hesaba katılmıştır) yöntemlerinde absorbans değerleri antioksidanların artan miktarlarıyla artmıştır. Test edilen tüm antioksidanların en yüksek doğrusal korelasyon katsayılarının ($r^2 > 0,99$) CUPRAC yöntemi ile elde edildiği görülmüştür. Bununla birlikte, DMPD ve TBARS yöntemlerinde ise serbest radikal miktarı ortam içindeki antioksidan miktarının artması ile azalmış ve serbest radikallerin miktarını gösteren absorbans değerlerinde de azalma gözlenmiştir. Bu azalma DMPD için neredeyse doğrusal iken TBARS için ise doğrusallıktan sapma göstermiştir.

Bu çalışmada eklenen antioksidan konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak TAC'daki artış ve TOC'daki azalışın mutlak değerleri arasında bir ilişki kurulmuştur. Bu basit ilişki esas olarak TOC sonuçlarına dayanan tibbi biyoanaltik kimya ile genellikle TAC sonuçlarını kullanan gıda analitik kimya arasında bir köprü oluşumunu başlatabilir çünkü bu iki dal birbirinden oldukça farklı diller kullanmaktadır. Böylece serum antioksidan kapasitesinin duyarlı ve kesin olarak ölçülmesinin, hastalıkların teşhisinde ve tedavi sürecinin izlenmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

SUMMARY

THE CORRELATION BETWEEN REACTIVE OXYGEN SPECIES CONSUMPTION OF ANTIOXIDANTS AND THEIR CUPRAC ANTIOXIDANT CAPACITY

Oxygen is essential for life, but it may also have harmful effects on the organism. Oxygen forms various reactive oxygen species (ROS), i.e.,superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radical etc, in the respiratory chain. Reactive oxygen species are scavenged by synthetic or dietary taken antioxidants. Therefore measurement of the radical scavenging activity of these antioxidants has great importance. In this study Reactive Oxygen Species (ROS) were generated by Fe(II)-H_2O_2 and Fe(III)-H_2O_2 reaction. ROS scavenging activity of the synthetic antioxidants added in the same medium were determined with thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and N, N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) methods and so the "Total Oxidative Conversion (TOC)" were determined. Total antioxidant capacities (TAC) of selected antioxidants were measured with CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) method and trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS / TEAC) method. The method was applied to the synthetic antioxidants firstly and later it was applied to a real biological fluid namely serum.

The experiments made in this work showed that, there is a linear relationship between antioxidant molar concentration and absorbance changes in the CUPRAC and ABTS methods of TAC measurement, *i.e.* abs. (or Δabs.) increases linearly with antioxidant concentration. The highest linear correlation coefficients (r^2 > 0.99) comprising all tested antioxidants were obtained for the CUPRAC method. On the other hand, there is a distinct decrease of ROS (measured as TOC) with increasing amounts of antioxidants, as reflected by the decreasing absorbances of DMPD and TBARS methods in response to antioxidant addition. This decrease was almost linear or curvi-linear for DMPD, and pseudo-linear or basically non-linear for TBARS.

This work has established an inverse relationship between oxidative conversion and antioxidant capacity in the form of a curvi-linear relation between the absolute values of increments in TAC and decrements in TOC as a function of added antioxidant concentration. This simple relationship between TAC and TOC may initiate the formation of a bridge between medical bioanalytical chemistry mainly relying on TOC results and food analytical chemistry often using TAC results, because these two disciplines are known to frequently use quite different languages. Thus, the accurate and precise measurement of serum antioxidant capacity may play an important role in monitoring the diagnosis and treatment process of diseases.

1. GİRİŞ

En dış yörüngede eşleşmemiş elektrona sahip moleküller olarak tanımlanan "serbest radikaller" normal metabolik reaksiyonlar sonucu ya da sigara, alkol kullanımı, hava kirliliği, bazı ilaçlar ve radyasyona maruz kalma gibi nedenlerle oluşabilirler. Genellikle kararsız ve çok reaktiftirler [1,2]. Radikaller lipitlere, proteinlere veya DNA'ya zarar verebilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) kanser, kalp hastalıkları, şeker hastalığı, damar sertliği, katarakt gibi çeşitli ciddi hastalıkların oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Bunların meydana getirdiği hasarlar hastalıkların yanı sıra yaşlanma süreciyle de ilişkilidir [3,4]. Potansiyel biyolojik hasara neden olan serbest radikallerin zararlı etkileri "oksidatif stres" olarak adlandırılır. Dokuları bu hasarlardan koruyabilmek için serbest radikallerin etkisiz duruma getirilmesi önemlidir. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile dengelenmektedir [5]. Antioksidanlar, gıdalarda veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğunda bir hedef molekülün oksidatif hasarını geciktiren, engelleyen veya ortadan kaldıran maddeler olarak tanımlanmaktadır [6,7].

Oksijenden üretilen radikaller, canlı sistemlerde meydana gelen radikallerin en önemli sınıfını temsil ederler [4]. ROS sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir. Bu nedenle, antioksidanların radikal süpürme aktivitelerinin ölçümü büyük önem taşımaktadır [8].

ROS, radikalik ve radikalik olmayan oksijen türlerini içerir. Örneğin hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir; fakat ROS olarak kabul edilir. Geçiş metal iyonlarının (Demir (Fe), Bakır (Cu), Çinko (Zn), Nikel (Ni), Mangan (Mn), Kobalt (Co), Kurşun (Pb) vb.) varlığında en reaktif ve hasar verici radikal olan hidroksil radikali (OH·) üretilir. Bu reaksiyon *"Fenton reaksiyonu"* olarak bilinir [9].

Antioksidan kapasite ölçümü oksidatif stresin neden olduğu değişiklikleri belirlemek için güvenli ve duyarlıdır. Bazı klinik, metabolik veya fizyolojik koşullar plazmadaki antioksidan kapasitenin farklı düzeylerde olmasına yol açabilir [10].

Aynı bireyden farklı zamanlarda alınan serum örneklerinin ya da belirli bir hastalığa sahip bir bireyden alınan serumun sağlıklı birey serumlarıyla karşılaştırılmasında TAC değerlerinde belirlenen farklılık klinik biyokimyada pek çok bulguya işaret edebilir. Daha önce de yapılmış bazı çalışmalarda kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklarının vücudun doğal antioksidan sistemi üzerine etkisi ortaya konmuştur [11].

Koracevic ve ark. [12] Fenton reaksiyonundan türetilen serbest oksijen radikallerinin etkisi altında oluşan ROS'u engellemek için biyolojik sıvıları kullanıp bunların antioksidan kapasitelerini ölçmüşlerdir.

Erdal ve ark**.** [13] migrenli hastalarda oksidatif stresin belirtisi olarak lipid peroksidasyonunu incelemişlerdir. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS), antioksidan sistemin göstergesi olarak da ürik asit ve albümin düzeylerini ölçmüşlerdir.

Kishikawa ve ark. [14] ROS nedeniyle oluşan oksidatif hasarın bir belirtisi olarak insan serumunun antioksidan aktivitesi üzerinde çalışmışlardır. Hastaların vücutlarında aşırı üretilen ROS'un derişimleri ve/veya aktivitelerinin süpürücüler tarafından azaltıldığını ve sonuç olarak hasta insanların serum antioksidan aktivitelerinin sağlıklı insanlara göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Başkol ve ark. [15] oksidan ve antioksidan parametreleri ile kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir. Bu amaçla, ileri evre mide kanserli hastalarda, lipid peroksidasyon ürünü olan serum TBARS düzeyleri ve antioksidan savunmanın bir üyesi olan tiyol seviyelerini araştırmışlardır. Serum TBARS seviyeleri hasta grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuş, tiyol seviyeleri ise mide kanserli grupta kontrole göre düşük bulunmuştur.

Nieto ve ark. [16] aterosklerozlu bireyler arasında yüksek serum ürik asit konsantrasyonu ile yükselmiş serum toplam antioksidan kapasitenin ilişkili göründüğünü bildirmiştir.

Bu çalışmada sentetik ve doğal örnekler üzerinde sentetik yollarla oluşturulan ROS tayin edildi. ROS Fenton reaksiyonu ve Fenton benzeri reaksiyon ile üretildi ve reaksiyon ortamına eklenen sentetik ve doğal antioksidanlar tarafından süpürülme dereceleri belirlendi. ROS tayini için tiyobarbitürik asit reaktif maddeler yöntemi (Thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) ve N,N-difenil-p-fenilendiamin probunun kullanıldığı N,N-Dimetil-p-fenilendiamin yöntemi (DMPD) kullanıldı. Daha önce N,N-Dimetil-p-fenilendiamin yöntemi Hirayama ve Unohara tarafından geliştirilen ultra eser miktardaki demir (III) tayini yönteminin modifiye edilmesine dayanmaktadır. Seçilen antioksidanların toplam antioksidan kapasiteleri (TAC), bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu(II)-Nc) kullanılarak polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin tayini için geliştirilen ve genel adı 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini' olan (CUPRAC) yöntemi ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak yararlanılan potasyum persülfatla 2,2′-azinobis (3-etilbenzotiazolin- 6-sülfonat) (ABTS)'in oksidasyonu sonucu üretilen $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonlarının kullanıldığı ABTS/Persülfat radikal süpürme yöntemi ile belirlendi. Deneylerde kullanılan ve TAC'ı belirlenen antioksidanlar reaksiyon ortamına eklenmeden önce ve eklendikten sonraki ROS ölçüldü. TAC'ın ROS süpürme etkinliği belirlendi. Sentetik karışımlar ile kesinleştirilen yöntem daha sonra insan serumu gibi gerçek bir biyolojik örneğe uygulandı.

Bu bağlamda serum antioksidan kapasitesinin duyarlı ve kesin olarak ölçülmesinin, hastalıkların teşhisinde ve tedavi sürecinin izlenmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olan oksijen; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapı taşlarını oluşturur. Ancak aerobik canlıların tüm hücrelerinde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijen, aynı zamanda çok tehlikeli formlar olan serbest radikallere dönüşmektedir [17]. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşmaktadır. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Eşleşmemiş elektron bulunması kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipit peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir [5,18].

Vücutta birçok reaksiyonda rol oynayan moleküler oksijen, insanın da yer aldığı aerobik organizmalar için önemli bir moleküldür ve yasam için mutlak gereklidir [19]. Vücut sürekli bir şekilde enerji üretim işlemlerinin bir parçası olarak oksijenle reaksiyona girer. Bu kimyasal reaksiyonlar moleküllerin oksidasyonunu ve indirgenmesini içerir. Reaksiyonun sonucunda üretilen serbest radikallerin, organizmada var olan ve/veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan *'oksidatif stres'*, DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatır. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açar. Serbest radikallerin giderilmesi dokuların hasarını önlemek için önemlidir [5,20].

2.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Birçok radikal türü olmasına rağmen biyolojik sistemlerde en çok görülen oksijenden oluşan ve genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. Oksijenden üretilen radikaller canlı sistemlerde meydana gelen radikallerin en önemli sınıfını temsil ederler. Oksijen kaynaklı radikaller normal aerobik yaşamın bir parçası olarak devamlı üretilmektedirler. Reaktif oksijen türleri mitokondride oksijenin elektron taşıma zinciri boyunca indirgenmesi veya çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile oluşmaktadır. Nispeten radikalik bir tür olamasına rağmen moleküler oksijenin (O_2) ardışık olarak indirgenmesiyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bir e^- kazanarak *süperoksit* ($O_2\bullet^-$) radikaline, 2 e^- alarak *hidrojen peroksite* (H_2O_2), 3 e- alarak *hidroksil* (OH•) radikaline dönüşür [7,21,22].

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2\bullet^-$$

Oluşan süperoksit anyonu "birincil" ROS olarak kabul edilir ve "ikincil" ROS oluşturmak için diğer moleküller ile etkileşime girebilir [4]. Süperoksitlerin hidrojen peroksite çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilir.

$$O_2^-\bullet + O_2^-\bullet + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

SOD enzimleri biyolojik sistemlerde bu reaksiyonu hızlandırır. SOD tarafından katalizlenen bu tepkime *dismutasyon tepkimesi* olarak adlandırılır. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperokside özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınışına neden olabilir. Demir (III)' ün demir (II)' ye indirgenmesi Fenton reaksiyonunu hızlandırmaktadır [8,22,23].

H_2O_2 zayıf bir oksidan ve geçiş metali iyonları yokluğunda nispeten kararlı olan zayıf bir indirgen maddedir [24]. Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir; fakat ROS olarak kabul edilir. Yüksek konsantrasyonlarda güçlü oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açarak zararlı etki gösterebilir. H_2O_2 serbest radikal biyokimyasında

önemli bir bileşiktir ve çok kolay bozulur. Özellikle geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali (OH•) üretilir [25].

Hidroksil radikali kaynağı büyük olasılıkla Haber-Weiss reaksiyonudur. O_2•- radikali hücresel Fe^{3+}' ü Fe^{2+}'ye indirger. Bu şekilde Fe^{2+} ve hidrojen peroksit arasında Fenton reaksiyonunu başlatır [26].

$$O_2\bullet^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$$ Haber–Weiss reaksiyonu

$$O_2\bullet^- + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$$ Fenton reaksiyonu

Canlı sistemlerde ROS'un hem yararlı hem de zararlı etkileri vardır. ROS'un yararlı etkileri düşük ve orta konsantrasyonlarda meydana gelir. Örneğin; enfeksiyonlu maddelere karşı savunma etkisi görülür [4]. ROS ayrıca enerji üretimi, fagositoz, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve hücre içi sinyalizasyonda olumlu bir rol oynar. Diğer taraftan ROS proteinler, DNA ve lipidler gibi temel biyomoleküllere zarar verme yeteneğine sahiptir [27]. Serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas bir denge canlı organizmaların çok önemli bir yanıdır ve "*redoks düzenleme*" olarak adlandırılan mekanizmalar ile elde edilir. Redoks düzenlemesi yaşayan organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur [4].

Aşağıda ROS'un önde gelen radikal ve radikal olmayan (non-radikal) örnekleri yer almaktadır.

RADİKAL	**NON-RADİKAL**
Süperoksit radikali ($O_2\bullet^-$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH•)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Hidroperoksil radikali ($HO_2\bullet$)	Hipokloröz asit (HOCl)
	Singlet oksijen ($^1O_2$)

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

Moleküler oksijenin bir e^- kazanmasıyla oluşur [21]. Süperoksit radikal üretimi çoğunlukla bir hücrenin mitokondrisinde meydana gelir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri memelilerde enerji üretiminin (ATP) ana kaynağıdır ve bu nedenle yaşam için şarttır [4].

Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyal enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise SOD enzimi ile H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücresel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır. Süperoksitin aşırı üretimi hücresel metabolizmanın aşırı yükselmiş glukoz tarafından bozulduğu durumlarda gerçekleşir. ATP sentezi inhibe edilir ve elektron taşınım zinciri yavaşlar [28].

2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperoksit üreten herhangi bir sistem, dismutasyon tepkimesinin bir sonucu olarak aynı zamanda H_2O_2 de üretir. H_2O_2 zayıf bir oksidan ve geçiş metal iyonları yokluğunda kararlı, zayıf bir indirgendir. Kolaylıkla su ile karışır ve vücut tarafından bir su molekülü olarak kabul edilir [24]. Sadece yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunda toksik kabul edilir. Herhangi bir çiftlenmemiş e^-'a sahip olmadığından kendisi bir serbest radikal değildir [29].

Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş metal iyonlarının varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturma yeteneğinden dolayı vücut bunlara karşı savunma mekanizması geliştirmiştir. İstenmeyen H_2O_2 katalaz, glutatyon peroksidaz (selenyum içeren) ve diğer bazı peroksidazların etkisi ile hücre dışına çıkarılabilir [24]. Bu enzimlerle su ve oksijen gibi ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır [18]. Başlıca önemi, reaktif geçiş metalleri varlığında, hidroksil radikali oluşumu için bir kaynak oluşturmasıdır [25].

2.2.3. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidroksil radikali hidroksit iyonunun nötr şeklidir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H^+'in birleşmesinden oluşur. OH• radikali çok yüksek reaktiviteye

sahip, yarı ömrü çok kısa (yaklaşık 10^{-9} s) tehlikeli bir radikaldir [4,28]. Hidroksil radikali suyun yüksek enerjili iyonizasyonundan kaynaklanan önemli bir üründür [24].

$$H_2O \longrightarrow OH\bullet + H^+ + e^- \longrightarrow H_2O_2$$

Canlı organizmalarda hidroksil radikalinin süpürülmesi için özel bir molekül veya enzim bulunmamaktadır. Bundan dolayı hidroksil radikali sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir [8]. Lipidler, proteinler nükleik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyolojik moleküllerin tüm sınıflarını yükseltgeyebilen en etkin radikaldir. Bu nedenle vücutta OH• radikali artışı ateroskleroz, siroz, diyabet, kanser, Alzheimer hastalığı, amfizem ve yaşlanma da dahil olmak üzere pek çok oksidatif hasar kaynaklı hastalığa neden olabilir.

Hidroksil radikali kaynağı Haber-Weiss reaksiyonudur. $O_2\bullet$- radikali hücresel Fe^{3+} 'ü Fe^{2+}'ye indirger. Bu şekilde de Fe^{2+} ve hidrojen peroksit arasında Fenton reaksiyonunu başlatır [26].

Lipid peroksidasyonunu başlatmak hidroksil radikalinin tartışılmaz yeteneğidir [22]. Biyolojik sistemlerde çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Peroksidasyon dizisinin zincir başlatılmasında OH• membran fosfolipidlerinin, doymamış yağ asidi yan zincirlerine hücum eder. Doymamış yağ asidi yan zincirlerinin metilen (-CH_2-) grubuna bağlı bir H atomunu koparak su oluşumunu sağlar. Bir hidrojen atomu sadece tek bir elektron içerdiğinden karbon üzerinde bir çiftlenmemiş elektron geride bırakır (-CH•-). Bu reaksiyon sonunda membranda -CH•- radikali kalır. Bu -CH•- radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur. Peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca peroksiller ortamdaki hidrojen atomları ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri de oluştururlar.

$$-CH_2- + \bullet OH \longrightarrow -CH\bullet- + H_2O$$

$$-CH\bullet- + O_2 \longrightarrow -CHO_2\bullet- \qquad \text{Hidroperoksil}$$

$$-CHO_2\bullet- + -CH_2- \longrightarrow -CHO_2H- + -CH\bullet- \qquad \text{Lipit Hidroperoksit}$$

Lipid peroksidler daha sonra malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler [24,25,28].

2.2.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Eşlenmemiş elektron içermediğinden Singlet oksijen serbest radikal değildir. Oksijenin yüksek reaktif bir şeklidir. Singlet oksijen oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda son derece önemlidir [24]. Hipokloröz asit ve H_2O_2 ' nin reaksiyonu ile de üretilebilmekte ve patofizyolojik önemi hala tartışılmaktadır [25].

2.2.5. Hidroperoksil Radikali ($HO_2\bullet$)

Hidroperoksil radikali süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşur. Süperoksitten daha güçlü bir oksidan ve daha güçlü bir indirgeyicidir. Biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi önemlidir [24].

2.2.6. Hipokloröz Asit (HOCl)

Aktif nötrofillerde oluşan güçlü bir oksidandır. Nötrofil sitoplazmasında bulunan "hem" içeren bir enzim olan miyeloperoksidaz etkisi ile H_2O_2 ve klorür iyonlarından (Cl^-) HOCl oluşmaktadır.

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \longrightarrow HOCl + H_2O$$

Hipokloröz asit Fe^{2+} bağımlı ve Fe^{2+} bağımsız iki reaksiyon ile hidroksil radikali oluşumunu arttırabilir [24].

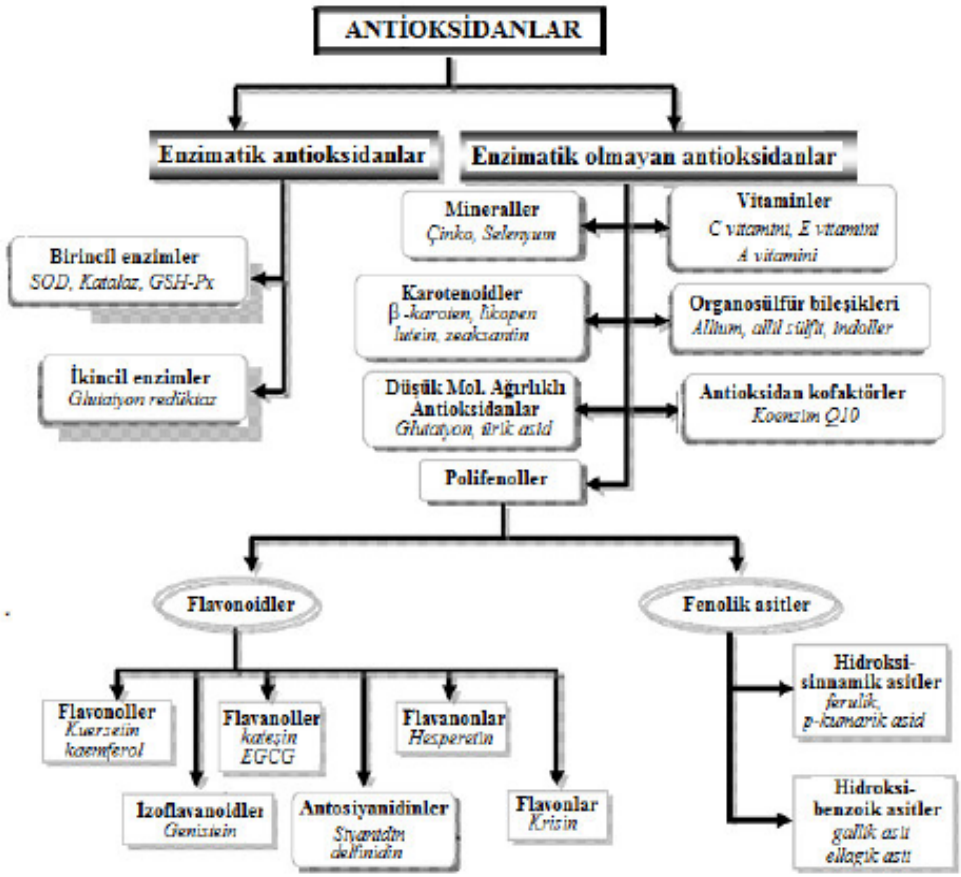
$$HOCl + O_2\bullet^- \longrightarrow OH\bullet + Cl^- + O_2$$

$$HOCl + Fe^{2+} \longrightarrow OH\bullet + Cl^- + Fe^{3+}$$

2.3. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [30]. Organizmada oluşan anabolik ve katabolik olayları ve tüm metabolizmayı etkileyen ve bir kısmı enzimlerin aktif gruplarında yer alan, yokluğu ve yetersizliği fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da önemli ölçüde azalmasına neden olan antioksidan

maddelere karşı ilgi artmış ve bilimsel araştırmalara konu olmuştur [17]. Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir [31]. Antioksidanlar bir çok hastalıkta tedavi ajanları olarak önem kazanmıştır. İnsan antioksidan savunması katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimatik süpürücüler; üre, askorbat, glutatyon ve flavonoidler gibi hidrofilik süpürücüler; tokoferoller, karotenoidler ve ubikinol gibi lipofilik radikal süpürücüler ile donatılmıştır [32].



Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması [32,33]

Antioksidan aktivitesi olan doğal gıdaların tüketimi hastalıklarla mücadelede en etkili yol olarak kabul edilir. Antioksidan etki gücünü ölçmek gıda kalitesini değerlendirmek ve hastalıkların teşhis ve tedavisi için önemlidir [34].

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanların zararlarını önlerler:

1. Temizleme etkisi: Enzimler tarafından oksidan molekülleri zayıf hale getirilip oksijen ile reaksiyona girerek oksijen konsantrasyonunu azaltırlar.
2. Baskılama etkisi: Vitaminler ve flavonoidler tarafından oksidanlara bir hidrojen atomu verilerek hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyip peroksidasyonun başlamasını önlerler.
3. Onarma etkisi: Serbest radikallerin oluşturduğu hasarları onarırlar.
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar arasında fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olan α-tokoferoller yer almaktadır [17,28].

Antioksidanlar, yağların oksidasyonunu önlemeyi ve/veya yavaşlatmayı sağlarlar. Gıdalardaki antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyici veya mevcut olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özelliğe sahiptir. Lipidlerin (L) radikalik oksidasyon zincir reaksiyonu:

Başlangıç

$LH \longrightarrow L^{\cdot}$ (başlatıcı) (1)

Çoğalma

$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$ (2)

$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\cdot}$ (3)

(Oluşan $L^{\cdot}$ radikali, ilk reaksiyona geri döner ve yeni $LOO^{\cdot}$ oluşturur.)

Zincirin son bulması

$LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \longrightarrow$ radikaller, radikal olmayan ürünlere dönüşür (4)

$LOO^{\cdot} + L^{\cdot} \longrightarrow$ radikaller, radikal olmayan ürünlere dönüşür (5)

$L^{\cdot} + L^{\cdot} \longrightarrow$ radikaller, radikal olmayan ürünlere dönüşür (6)

Antioksidanların bu zinciri kırıcı etkileri vardır.

$LOO^{\cdot} + AoxH$ (antioksidan) $\longrightarrow LOOH + Aox^{\cdot}$ (7)

$Aox^{\cdot} + LOO^{\cdot} \longrightarrow$ Antioksidanlar sayesinde radikal olmayan ürünler oluşur. (8)

$Aox^{\cdot} + Aox^{\cdot} \longrightarrow$ Antioksidanlar sayesinde radikal olmayan ürünler oluşur. (9)

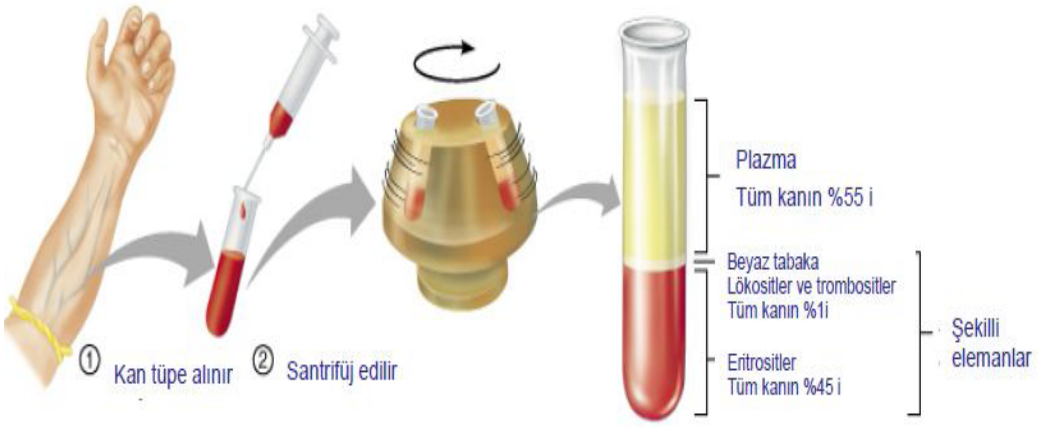
Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincir reaksiyonlarını (örneğin lipidlerin oksidatif parçalanmasına yol açan radikalik zincir reaksiyonunu) kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı

bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi (örneğin biyolojik makromolekülleri) koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam ederler [7].

2.4. KAN

Kan, plazma adı verilen sıvı ortam içinde kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) süspansiyon halinde dağıldığı, damar sisteminin içini dolduran ve kalbin pompa gücü sayesinde bu sistem içinde tüm vücudu dolaşan bir dokudur. Görevleri, taşıma, düzenleme ve savunma olmak üzere üç grup altında toplanabilir. Kan hücreleri; eritrositler (alyuvarlar, kırmızı kan hücreleri), lökositler (akyuvarlar, beyaz kan hücreleri) ve trombositlerdir (kan pulcukları, plateletler). Yetişkinlerde eritrosit, trombosit ve lökositlerin büyük kısmı kemik iliğinde yapılmaktadır.

Kanın, antikoagulan ilave edilmeden bir tüpe alınıp santrifüj edilmesiyle oluşan pıhtı yumağından sarı renkte bir sıvının ayrıldığı gözlenir. Bu sıvıya *serum* adı verilmektedir. Plazma ile serum, bir önemli fark dışında, yapı olarak aynıdır. Aralarındaki en önemli fark serumda kanın pıhtılaşmasında görev alan bazı pıhtılaşma faktörleri veya proteinlerin, özellikle fibrinojenin, bulunmamasıdır. Bu nedenle seruma fibrinojensiz plazma da denilmektedir [35,36].



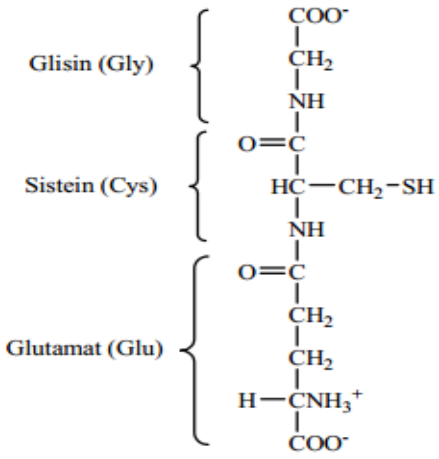
Şekil 2.2 : Kandan plazma eldesi, kan ve plazma oranları

Plazmanın %90'ı su, %10'u ise çözünmüş halde bulunan organik ve inorganik maddelerden oluşmaktadır.

2.5. SERUMDA BULUNAN KÜÇÜK MOLEKÜLLÜ ANTİOKSİDANLAR

2.5.1. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH), başta karaciğerde olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan ve glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptitdir. GSH molekülünde çok sayıdaki hidrofilik fonksiyonel grubun düşük molekül ağırlıklı atomlarla birleşmesi bu molekülün su, etanol ve amonyak gibi polar çözücüler içinde kolaylıkla çözünmesine neden olmaktadır.



Şekil 2.3 : Glutatyonun Yapısı

Glutatyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır. GSH, glutatyon peroksidazın ön maddesidir. Glutatyon peroksidazlar (GPx), lipid hidroperoksitleri (ROOH) veya hidrojen peroksidi indirgeyerek (H_2O_2) serbest radikal oluşumunun azalmasını sağlar. Bu enzim ROOH'ı indirgeyerek alkole (Reaksiyon I) ve H_2O_2'i indirgeyerek suya (Reaksiyon II) dönüştürür. Ayrıca GSH'ın GSSG' ye oksitlenme reaksiyonunu katalizler [37-39].

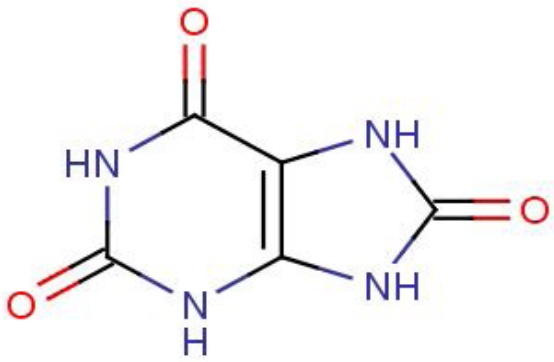
$$2GSH + ROOH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O \quad (I)$$

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O \quad (II)$$

Serbest radikallerin direkt ölçüm yöntemlerinin zorluğu nedeniyle indirgenmiş glutatyon ölçümünün yapılması oksidatif stresin ve antioksidan savunma sisteminin durumu hakkında bize önemli bilgiler sağlar [40].

Hücre içerisinde indirgen formda bulunur. Glutatyon etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı indirgenmiş halde tutulmalıdır. Bu reaksiyonu glutatyon redüktaz katalizler. Yapılan çalışmalarda diyabette GSH düzeylerinin sağlıklı kişilerden anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmektedir [28].

2.5.2. Ürik Asit



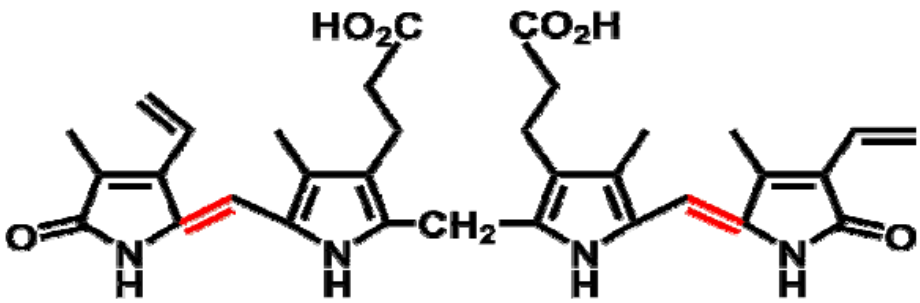
Şekil 2.4 : Ürik Asitin Yapısı

Ürik asit (ürat), karbon, azot, oksijen ve hidrojenden oluşan, formülü $C_5H_4N_4O_3$ olan bir organik bileşiktir. Ürik asit, insanlarda pürin metabolizmasının son ürünü olarak ksantin oksidaz enzimi etkisiyle ksantinden oluşur. Serum ürik asit seviyeleri hem çevresel hem de genetik faktörler tarafından etkilenmektedir [41].

Kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olan diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi ve insülin direnci gibi birçok klinik durum, serum ürik asit düzeyi ile de ilişkilidir. Yapılan çalışmaların birçoğunda, serum ürik asit yüksekliğinin kardiyovasküler olay ve

kardiyovasküler olaylardan kaynaklanan ölüm riskini artırdığı gösterilmiştir. Ürik asitin %98'i plazmada sodyum-ürat şeklinde serbest olarak bulunur [42,43].

2.5.3. Bilirubin



Şekil 2.5 : Bilirubinin Yapısı

Bilirubin hücrelerden dışarı çıkan hemoglobinin parçalanıp metabolize edilmesi sonucunda oluşan bir son üründür [36]. Bilirubin ve türevlerine safra pigmentleri de denir. Total bilirubin, direkt (konjuge) ve indirekt (ankonjuge) bilirubin olarak iki kısımdan oluşur. Bilirubine iki molekül glukuronik asit eklenir. Oluşan bilirubin diglukoronidin suda çözünürlüğü artar. Bilirubin direkt forma dönüşmüştür. Karaciğerde konjugasyona uğramadan önceki bilirubine indirekt bilirubin denir. İndirekt bilirubin proteine bağlı olarak taşındığından kan beyin bariyerini geçemez, konsantrasyonu yükselince tümüyle proteine bağlanamadığından kan beyin bariyerini geçer ve beyinde kalıcı hasar bırakır. Direkt bilirubin safra kanallarında salınır, safra ve idrarla atılır. İndirekt bilirubinin yükselmesi hemolitik sarılığa; direkt bilirubinin artışı ise hepatik doku hasarı veya kolestaza işaret eder. Bilirubin çok efektif bir lipit antioksidandır. Bilirubinin mikromolar konsantrasyonlarda dahi peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davrandığı gösterilmiştir [44].

2.6. SERBEST RADİKAL TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

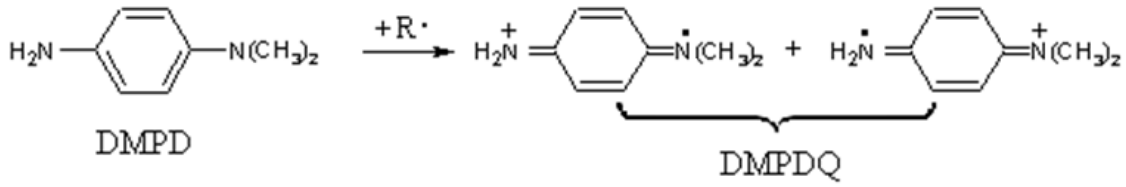
2.6.1. N,N-Dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) Yöntemi

Reaktif oksijen türlerinin ölçümü için kullanılan yöntem daha önce Hirayama ve Unohara tarafından [45] eser miktardaki Fe(III)'ün belirlenmesi için geliştirilmiştir. Yöntem zayıf asidik ortamda N, N-dimetil-p-fenilendiaminin hidrojen peroksit ile

oksidasyonu üzerinde demir (III)'ün etkisine dayanmaktadır. Demir (III) burada katalizör olarak görev almaktadır. Reaksiyon katalitik demir olmadan çok yavaş gerçekleşir. Reaksiyon sonucunda iki tane koyu pembe renkte DMPD'nin yarı kinon (DMPDQ) türevleri oluşmakta ve bunlar kinon radikali olarak adlandırılmaktadır.

Reaksiyon sonucunda 514 ve 550 nm dalgaboylarında, oluşan DMPDQ'dan kaynaklanan iki absorpsiyon piki gözlenmektedir. Reaksiyon sonunda oluşan ürün 514 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmiştir.

Reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir;



Orijinal yöntemde sırayla 2,4 ng/mL Fe^{3+} + 1 mL pH 5,7 asetat tamponu + 1 mL %3,5' lik H_2O_2 eklenir ve hacim saf su ile 24 mL'ye tamamlanır. Karışım 25°C'de 5 dakika su banyosunda bekletildikten sonra 1 mL $2{,}4x10^{-2}$ M DMPD (N,N-Dimetil-p-fenilendiamin) ilave edilir. Su banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığında 5 dk tutulduktan sonra absorbans suya karşı 514 nm'de okunur.

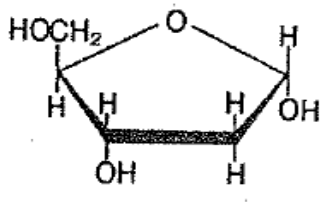
2.6.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi

Pek çok hastalığın oluşumundan sorumlu serbest radikallerin çok reaktif ve kısa ömürlü olmalarından dolayı ölçümleri kolay olmaz. Bunun yerine serbest radikallerin lipitler, proteinler ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan ürünlerin ölçümü, dolaylı olarak serbest radikallerin etkinliğinin belirtecidir. Lipitler serbest radikal hasarına karşı daha hassastırlar [44]. TBARS testi lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) ölçümüne dayanır [46]. TBARS testi biyolojik sistemlerde ve gıdalarda lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için en sık kullanılan ve bilinen en eski testlerden biridir, son zamanlarda kompleks biyolojik metaryallerde uygulanması artmıştır. Bu deneme basit, karmaşık enstrümantasyon gerektirmeyen, yüksek duyarlılıkta bir yöntemdir. Laboratuar kullanımı için uygundur [8].

Hidroksil radikal oluşumu Fenton reaksiyonuyla değişik biçimlerde gerçekleştirilebilir. Biyolojik sistemler yüksek enerjili radyasyona her zaman maruz değillerdir. Hidroksil

radikalinin biyolojik sistemlerde üretimi büyük olasılıkla Fenton tipi reaksiyonlarla, yani hidrojen peroksit ile geçiş metal iyonlarının reaksiyonuyla gerçekleşir [8,47].

Bu reaksiyonlarla hidroksil radikali oluşumunun kanıtı deoksiribozun bozunmasıdır. Oluşan hidroksil radikali deoksiriboza hidrojen çıkarma mekanizması yoluyla saldırarak TBA reaktif maddeler (TBARS) açığa çıkartır.

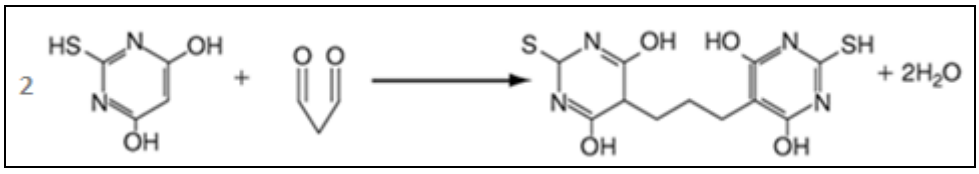


Şekil 2.6: 2- Deoksi -D- Riboz

TBARS denemesinde Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikallerinin 37 ºC'lik inkübasyon sırasında dedektör molekül deoksiriboza saldırması sonucunda oluşan malondialdehit düşük pH da ısıtıldığında iki molekül TBA ile reaksiyona girerek kromojen ürün (TBA_2-MDA) oluşturur.

$OH^{\bullet}$ + deoksiriboz → MDA

2 TBA + MDA → kromojen ürün



Şekil 2.7: TBA_2-MDA oluşum reaksiyonu

Renk gelişimi reaksiyon karışımına trikloroasetik asitin (TCA) sulu çözeltisi ve bunu takiben sodyum hidroksitte hazırlanmış tiyobarbitürik asit çözeltisinin eklenmesiyle meydana gelir. Reaktifler iyice karıştırıldıktan sonra tüpler 10-15 dakika 100ºC'de (kaynar su banyosunda) bekletilir ve sonra soğutulur. Pembe TBA ürününün (λmax = 532 nm) absorbansı suya karşı ölçülür. Reaksiyon karışımına hidroksil radikal süpürücü bileşik eklendiğinde hidroksil radikalleri için deoksiriboz ile yarışır ve deoksiriboz bozunmasını azaltır.

Bu yöntem sırasında kontrol edilmesi gereken diğer noktalar, süpürücünün hidroksil radikalinin üretimini engellememesi, süpürücüye saldıran hidroksil radikalinin kromojen ürün oluşturmamasıdır [8].

2.6.3. Hidroksil Radikali Süpürme Yöntemi

Bu yöntem Bektaşoğlu ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Hidroksil radikalleri Fe(II) + EDTA + H_2O_2'den oluşan Fenton reaksiyonuyla üretilmiş ve radikal oluşumu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile salisilat probu kullanılarak gösterilmiştir. Bu şekilde oluşan hidroksil radikallerinin süpürücü varlığında veya yokluğunda prob madde (salisilat) ile reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksi benzoikasitler etil asetat ile ekstrakte edilerek reaksiyon ortamından organik faza çekilmiştir.

Süpürücü varlığında ve yokluğunda organik fazda toplanan hidroksi benzoik asitlerin miktar tayini, bu faza $CuCl_2$, Nc ve amonyum asetat tamponu (pH 7 tamponu) ilavesi sonunda 30 dakika beklemekle, reaktif körüne karşı 450 nm absorbansının ölçümü yoluyla yapılmıştır [8,48].

2.6.4. Süperoksit Radikali Süpürme Yöntemi

Yöntem ksantin/ksantin oksidaz kompleksinden oluşan süperoksit radikalinin 4-nitroblue tetrazolyum klorür (NBT)'nin indirgenmesinin ölçümüne dayanır. Tetrazolyum çözeltisi yapmak için EDTA'lı fosfat tamponu (pH=7,4) içerisinde ksantin ve NBT çözülür. Bu oluşan çözeltinin bir kısmı örnek çözeltisine eklenir. Reaksiyon ksantin oksidaz çözeltisi eklenmesiyle başlatılır. Karışım, 20 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilir ve daha sonra HCl ilave edilerek sona erdirilir. Oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de kontrol çözeltisine karşı okunur [49,50].

2.7. ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerini genel olarak iki gruba ayırabiliriz.

1- Hidrojen Atomu Transferi (HAT) esasına dayanan yöntemler: Serbest radikallerin antioksidan maddenin hidrojeni ile etkisiz hale gelmesinin ölçülmesi ile tayin edilir.

2- Elektron Transferi (ET) esasına dayanan yöntemler: Antioksidanların elektron transfer etmesi ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşiklerin indirgenmesine dayanan yöntemlerdir.

Bu yöntemlerden Toplam Radikal Tutma Parametresi (TRAP), Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC), Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi (TEAC) ve DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) yöntemleri aynı zamanda serbest radikal tayinlerinde de kullanılmaktadır.

2.7.1. HAT – Hidrojen Atomu Transferi Esasına Dayanan Yöntemler

2.7.1.1. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

TRAP yönteminde 2,2' azobis(2-metilpropiyonamid)dihidroklorürden (ABAP) peroksil radikali üretilir. ABAP ilave edildikten sonra, oksitlenebilen maddelerin oksidasyon reaksiyonu sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesi ile takip edilir. Oksidasyon antioksidanlar tarafından yavaşlatılır [51]. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek toplam antioksidan miktarı, troloks ile bulunan sonuçlarla karşılaştırılarak troloks cinsinden hesaplanmaktadır [25]. Antioksidan aktivitesi; zamanla antioksidanların tükenmesi yani okside olmuş prob maddenin görülme süresinin uzaması ile belirlenir. TRAP metodu genellikle glutatyon, askorbik asit, tokoferol, β-karoten gibi enzimatik olmayan antioksidanları ölçtüğü için çoğunlukla serum ve plazmanın antioksidan kapasitesini ölçmek amacıyla kullanılır [52].

2.7.1.2. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yönteminde AAPH (2,2' azobis(2-amidinopropan)hidroklorür) peroksil radikalini oluşturmak için, Cu^{2+}-H_2O_2 ise hidroksil radikalini oluşturmak için kullanılır. Ayrıca yükseltgenebilen substrat olarak β-fikoeritrin (PE) veya floressein kullanılmaktadır. Bu yöntem peroksil radikalinin neden olduğu oksidasyonun antioksidan tarafından inhibisyonunu temel almaktadır. Bu da floresans yoğunluğundaki azalma ile belirlenebilir. Floresan madde peroksil radikalleri tarafından yükseltgenerek floresans özellik göstermeyen bir ürüne dönüşür. Reaksiyon ilerledikçe floresein veya β-PE tüketilir. Antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilir ve floresans azalması inhibe edilir. ORAC sonuçları μM Trolox eşdeğeri olarak belirtilir [51,53].

2.7.2. ET- Elektron Transferi Esasına Dayanan Yöntemler

Bu elektron transfer bazlı yöntemler, reaksiyon karışımında iki bileşen içerirler, antioksidanlar ve oksidanlar (problar). Aşağıdaki elektron transfer reaksiyon temeline dayanırlar;

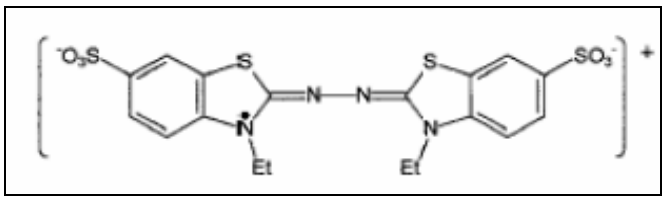
Prob (Oksidan) + e^- (antioksidan) ⟶ indirgenmiş prob + yükseltgenmiş antioksidan

Prob antioksidanlardan elektron alır ve bunun sonucunda indirgenmiş probun rengi değişir. Renklerindeki değişim derecesi başlangıç örneğindeki toplam antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır [54].

2.7.2.1. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ ABTS Yöntemi

Yöntem ilk defa Miller ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Yöntem 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) bileşiğinden radikal katyonu oluşturarak, bu katyonun antioksidanlar tarafından giderilmesine dayanmaktadır. ABTS radikali, H_2O_2 ve HRP (Horse Radish Peroksidaz) varlığında enzimatik sistemlerde oluşturulabilir. Bu ABTS radikali ($ABTS^{\cdot+}$); renklidir, oda sıcaklığında kararlı olmasına rağmen 35 °C'nin üzerinde ve pH 7,5 üzerinde kararsızdır [25]**.**

Re ve arkadaşları [55] tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş yönteminde potasyum persülfatla ABTS (2,2′-azinobis (3-etilbenzotiazolin- 6-sülfonat))'nin oksidasyonu sonucu üretilen $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonları kullanılır. Üretilen bu ABTS radikalleri oda sıcaklığında karanlıkta beklediği zaman 2 gün kararlıdır. Bu yöntem yağda ve suda çözünebilen antioksidanlara, saf maddelere ve bitki ekstrelerine uygulanabilmektedir.



Şekil 2.8: $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun yapısı

Yöntem bu katyonun antioksidanlar tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır, yani bir renk giderme yöntemidir. Antioksidanlar varlığında $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun

absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasite bulunur. Örneklerde bulunan antioksidan bileşikler, radikal çözeltisinin rengini gittikçe açarak 6 dakikalık süreçte absorbans değerleri zamana bağlı olarak düşer. 6.dk sonunda 734 nm'de absorbans değeri okunur.

2.7.2.2. Folin Ciocalteu (FC) Yöntemi

Doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü olarak kullanılmıştır. Ancak aynı zamanda temel mekanizma yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarına dayandığı için TAC yöntemlerinden biri olarak kullanılabilir [56]. Folin-Ciolcalteu (FC) reaktifi sadece fenolik bileşenlere özgü değil, pek çok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneğine sahiptir. FC temelli yöntem, gerçekte örneğin indirgeme kapasitesini tayin etmektedir. Bu yöntemde kullanılan $CuSO_4$ (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdik fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat ayıracını heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür [20]. Reaksiyon bazik ortamda gerçekleşir (pH yaklaşık 10) [25].

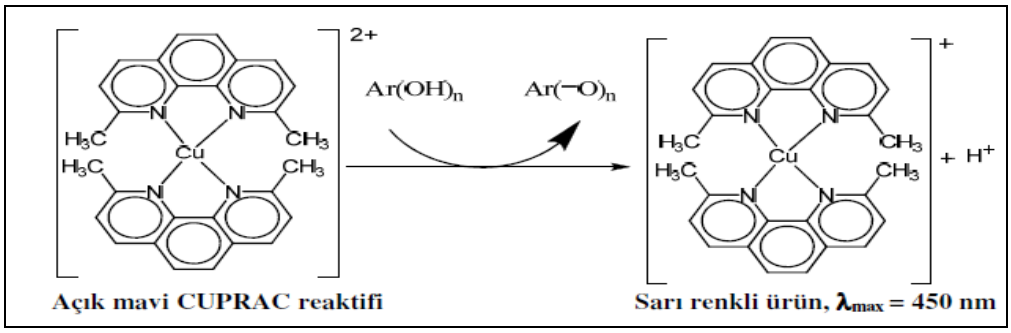
2.7.2.3. DPPH (2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil)Yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların serbest radikalleri süpürme kabiliyetlerini ölçmek için yaygın olarak kullanılır. Bu spektrofotometrik yöntemde kararlı bir serbest radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) reaktifi kullanılır. Antioksidanların DPPH radikalini indirgeme yeteneklerinin ölçümüne dayanan bir yöntemdir [56, 57]. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 515 nm'de maksimum absorbsiyon verir. Etanol veya metanollü DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi kırmızıdan sarıya döner [20,58].

2.7.2.4. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu(II)-Nc) kullanılarak polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin tayini için geliştirilen spektrofotometrik CUPRAC yöntemi antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin kompleksinin renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesi ve bu kelatın

maksimum ışığı soğurduğu 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır [34,59].



Şekil 2.9: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu

Bu yöntem; Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karsı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Antioksidan bileşikler indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler [33].

n $Cu(Nc)_2^{2+}$ + n-elektron indirgen (AOx) → n $Cu(Nc)_2^{+}$ + n-elektron yükseltgen ürün + n H^+

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 [48,60]. Daha sonra proteinlerin, kolay yükseltgenebilen bazı amino asit gruplarının, özellikle tiyol içeren proteinlerin de TAC üzerine katkısının belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiştir [61].

2.7.2.5. FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi

FRAP yöntemine göre, 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 [25,62].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal madde ve örnekleri tartmak için Radwag AS 220/C/2 hassas terazi, pH ölçümleri için HANNA HI 221 pH metre, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Elmasonic marka ultrasonik banyo, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Wisemix VM-10 girdap karıştırıcı, distile su üretimi için GFL 2008 su sistemi, Varian Cary 1E model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışın yollu bir çift kuartz küvet, ısıtma işlemleri için Chiltren hotplate HS31 ısıtıcı, inkübasyon işlemleri için Nickel Weston-S-mare avon su banyosu kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır(II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$), neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin) hidroklorür (Nc), amonyum asetat (CH_3COONH_4), demir (III) klorür hekzahidrat ($FeCl_3.6H_2O$), asetik asit (CH_3COOH), sodyum asetat (CH_3COONa), sodyum hidroksit (NaOH), sülfirik asit (H_2SO_4), H_2O_2 (%30'luk), N,N-Dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD), dipotasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum klorür (NaCl), 2-deoksi-D-riboz, etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu, amonyum demir (II) sülfat hekzahidrat ($(NH_4)_2Fe(SO_4).6H_2O$), hidroklorik asit (HCl), trikloroasetik asit (TCA), 2-tiyobarbitürik asit (TBA), etanol (EtOH), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonyum tuzu (ABTS, $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$), potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$), (+/-)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman (Troloks, $C_{14}H_{18}O_4$), kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$), (±)-kateşin hidrat ($C_{15}H_{14}O_6$), kafeik asit ($C_9H_8O_4$), naringin, p-kumarik asit (trans-4-hidroksi sinnamik asit), rutin hidrat ($C_{27}H_{30}O_{16}.xH_2O$), (-)-epikateşin ($C_{15}H_{14}O_6$), ürik asit ($C_5H_4N_4O_3$), glutatyon (GSH), askorbik asit ve L-sistein ($C_3H_7NO_2S$).

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1. Antioksidan Çözeltileri

3.3.1.1. Fenolik Antioksidan Çözeltileri

Fenolik antioksidanların (troloks (TR), kuersetin (QR), kateşin (CAT), kafeik asit (CFA), naringin (NG), *p*-kumarik asit (P-Cum), rutin (RT) ve epikateşin (EC)) etil alkolde konsantrasyonları $1{,}0x10^{-2}$ M olacak şekilde stok çözeltileri hazırlandı. Kullanılan uygun konsantrasyonlar, stok çözeltiden alınıp etil alkolle seyreltilerek yapıldı.

3.3.1.2. Sistein Çözeltisi

Tartılan CYS 0,5 mL 1 M HCl ile çözüldü ve 25 mL'ye saf suyla tamamlanarak $1{,}0x10^{-2}$ M lık stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden alınan hacim uygun oranda saf su ile seyreltildi.

3.3.1.3. Glutatyon Çözeltisi

Saf su ile çözülerek $1{,}0x10^{-2}$ M konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden alınan hacim uygun oranda saf su ile seyreltildi.

3.3.1.4. Askorbik Asit Çözeltisi

Saf su ile çözülerek $1{,}0x10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için uygun oranda saf su ile seyreltildi.

3.3.1.5. Ürik Asit Çözeltisi

Tartılan ÜA 1,0 mL 0,1 M NaOH ile çözüldü ve saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak $1{,}0x10^{-3}$ M konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden alınan hacim uygun oranda saf su ile seyreltildi.

3.3.2. CUPRAC Reaktif Çözeltileri

3.3.2.1. $CuCl_2.2H_2O$ Çözeltisi

Saf su ile çözülerek $1{,}0x10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.3.2.2. Neokuproin Çözeltisi

Neokuproin (Nc) EtOH ile çözülerek 7,5 x 10^{-3} M konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı.

3.3.2.3. Amonyum Asetat Çözeltisi

Amonyum asetat (NH_4Ac) saf su ile çözülerek (pH=7,0) olacak şekilde 1 M konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı.

3.3.2.4. pH 7 Üreli Tampon

Serum analizleri için amonyum asetat yerine üreli tampon kullanıldı. 0,086 M Tris (hidroksimetil)aminometan, 0,09 M Glisin, ve 4 mM Sitrat'tan oluşan karışım 8 M üre çözeltisi içinde çözüldü ve pH'sı HCl ile 7'ye ayarlandı.

3.3.3. ABTS Reaktif Çözeltileri

3.3.3.1. ABTS / Persülfat Çözeltisi

7,0 mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM $K_2S_2O_8$ ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi etanolle 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

3.3.3.2. PBS (Phosfate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi

Serum örnekleri için etanol yerine PBS tampon çözeltisi kullanıldı. 100 mM 50 mL K_2HPO_4 çözeltisi üzerine 100 mM KH_2PO_4 çözeltisinden damla damla ekleyerek pH 7,4 e ayarlanıp içerisinde 0,2 g NaCl çözüldükten sonra hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.4. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Yöntemi (TBARS) Çözeltileri

3.3.4.1. pH 7,0 Fosfat Tamponu

K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 ayrı ayrı su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak 0,1 M'lık çözeltileri hazırlanıp sırasıyla 57,8 mL ve 42,2 mL alınıp karıştırılarak pH 7,0 fosfat tamponu hazırlandı.

3.3.4.2. 2-Deoksi-D-Riboz Çözeltisi

2-deoksi-D-riboz saf su ile çözülerek 2x10^{-3} M konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.3.4.3. Na_2EDTA Çözeltisi

Na_2-EDTA saf su ile çözülerek 20 mM konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.3.4.4. Amonyum Demir (II) Sülfat ($(NH_4)_2Fe(SO_4).6H_2O$) Çözeltisi

Amonyum demir (II) sülfatın konsantrasyonu $2x10^{-2}$ M olacak şekilde tartılıp 1,0 mL 1M HCl ile çözüldü ve hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3.4.5. H_2O_2 Çözeltisi

% 30'luk H_2O_2 saf su ile seyreltilerek 10 mM'lık çözeltisi hazırlandı.

3.3.4.6. Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi

Trikloroasetik asit saf su ile çözülerek % 2,8'lik çözeltisi hazırlandı.

3.3.4.7. 2-Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi

TBA $5x10^{-2}$ M NaOH ile çözülerek % 1'lik çözeltisi hazırlandı.

3.3.5. N,N-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi Çözeltileri

3.3.5.1. Demir (III) Klorür ($FeCl_3$) Çözeltisi

$FeCl_3$ tartılıp 1 mL 0,5 M H_2SO_4 ile çözülüp saf su ile hacmi tamamlandı ve 10^{-2} M'lık stok çözeltisi hazırlandı. 10^{-7} M'a seyreltme işlemi 10^{-2} M H_2SO_4 ile yapıldı.

3.3.5.2. pH 5,7 Asetat Tamponu

Asetik asit ve sodyum asetatın ve ayrı ayrı 2 M'lık çözeltileri hazırlandı. Sırasıyla 4,75 mL ve 45,25 mL alınıp su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.5.3. H_2O_2 Çözeltisi

% 30'luk H_2O_2 saf su ile seyreltilerek % 3'lük çözeltisi hazırlandı.

3.3.5.4. N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DMPD) Çözeltisi

DPMD bir miktar saf su ile çözülüp üzerine 0,5 M 0,25 mL H_2SO_4 çözeltisi eklenip su ile tamamlanarak $1,2x10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözeltisi hazırlandı. 10^{-2} M H_2SO_4 çözeltisi ile 5 kez seyreltildi.

3.4. SERUM ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Kan, İÜ Sağlık Kültür ve Spor Daire Başkanlığı Avcılar Mediko Sosyal Birimi laboratuarında steril şartlarda sağlıklı gönüllülerden alındı. Kan örnekleri 13x100 çaplı,

sarı kapaklı, 5 mL'lik vakumlu kuru kan alma tüpleriyle alındı. Tüpteki kan örnekleri 5-6 kez yavaşça çalkalandıktan sonra kanın kendiliğinden pıhtılaşması için 10 dakika beklendi ve daha sonra 4500-5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum kapaklı polietilen tüpe aktarılarak analiz edilene dek buzdolabında 4^{o}C'de bekletildi.

Serum örneğini analizlerde kullanabilmek için buzdolabından çıkartıp oda sıcaklığına gelmesi için beklendi. Oda sıcaklığına gelen serum kullanıldığı yönteme göre uygun oranlarda saf su ile seyreltildi.

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER

Tez çalışmalarında toplam antioksidan kapasite tayinleri için CUPRAC ve ABTS/persülfat yöntemleri, serbest radikal tayinleri için de Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Yöntemi (TBARS) ve N,N-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi kullanıldı.

3.5.1. CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 1,0 x 10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL 7,5 x 10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH=7,0) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL antioksidan standart çözeltilerinden eklenip son olarak (2-x) mL distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Karışımın son hacmi 5mL'dir. Serumlu örnekler için de 1 mL 1 M amonyum asetat tamponu yerine 2 mL pH 7 üreli tampon çözeltisi kullanıldı ve yine hacim distile su ile 5 mL'ye tamamlandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans karışıma karşı 450 nm'deki absorbansları ölçüldü.

3.5.2. ABTS/Persülfat Yöntemi

Deney tüpü içerisine x mL antioksidan çözeltisinden konulup hacim EtOH ile 1 mL'ye tamamlandı. Üzerine 2 mL ABTS/persülfat çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve absorbans EtOH'e karşı 734 nm'de ölçüldü. Serumlu örneklerde EtOH yerine PBS tamponu kullanıldı.

3.5.3. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi

Deney tüpü içerisine sırasıyla, 3 mL pH 7,0 fosfat tamponu + 1 mL $2,0\times10^{-3}$ M 2-deoksi-D-riboz + 0,5 mL 20 mM Na_2EDTA + 0,5 mL 20 mM $FeCl_2$ + (4-x) mL H_2O + x mL süpürücü (antioksidan, antioksidan karışımı ve/veya serum) + 1 mL 10 mM H_2O_2 çözeltileri eklendi. Karışım 30 dakika 37 ºC su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda karışıma 5 mL % 2,8'lik TCA ve 5 mL % 1'lik TBA çözeltileri ilave edilip girdap karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 100 ºC'lik su banyosunda 10 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra akan musluk suyu altında soğutulan çözeltilerin suya karşı 532 nm dalgaboyunda absorbansları ölçüldü.

3.5.4. N,N-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi

ROS tayininde kullanılan DMPD yöntemi Hirayama ve Unohara tarafından ultra-eser demir (III) tayini amacıyla geliştirilen N,N-dimetil-p-fenilendiamin yönteminden modifiye edildi. Orijinal yöntemde sırayla 2,4 ng/mL Fe^{3+} + 1 mL pH 5,7 asetat tamponu + 1 mL % 3,5' lik H_2O_2 eklenir ve hacim saf su ile 24 mL' ye tamamlanır. Karışım 25 °C'de 5 dakika su banyosunda bekletildikten sonra; 1 mL 2,4 x 10^{-2} M DMPD (N,N-Dimetil-*p*-fenilendiamin) ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dk tutulduktan sonra absorbans suya karşı 514 nm'de okunur [45].

Modifiye edilmiş yöntemde ise deney tüpü içerisine sırasıyla 0,25 mL 10^{-7} M Fe^{3+} + 0,5 mL pH 5,7 asetat tamponu + 0,5 mL %3' lük H_2O_2 ve x mL süpürücü eklenip hacmi saf su ile 9 mL'ye tamamlandı. 25 °C'de 5 dakika su banyosunda bekletildi. Su banyosundan sonra; 1 mL 2,4 x 10^{-2} M'dan 1:5 oranında seyreltilmiş DMPD (N,N-Dimetil-*p*-fenilendiamin) ilave edilip çalkalandı. 25 °C'de 20 dakika daha su banyosunda bekletildi. Su banyosundan çıkarılıp suya karşı 514 nm'de absorbansı okundu.

3.5.4.1. N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yönteminin Optimizasyonu

Hirayama ve Unohara tarafından geliştirlen eser miktarda demir tayininden uyarlanan ve ROS tayininde kullanılan DMPD yöntemi aşağıdaki parametreler incelenerek optimize edildi.

pH Denemesi:

Modifiye DMPD Yönteminin optimum koşullarını belirlemek için pH çalışması yapıldı. 2,0 M HAc ve 2,0 M NaAC'in çözeltileri uygun miktarlarda karıştırılarak pH= 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 5,7 olacak şekilde tampon çözeltiler hazırlandı. Modifiye edilmiş DMPD Yöntemi her bir pH için Bölüm 3.5.4'de anlatılan şekilde süpürücü olarak 0,5 mL $1{,}0\text{x}10^{-4}$ M QR varlığında ve süpürücü yokluğunda (referans) uygulandı.

Zaman Denemesi

Orijinal yöntemde DMPD ilavesinden tam 5 dakika sonra absorbans ölçülmesine rağmen modifiye edilen yöntemde DMPD ilavesinden sonra her 5 dakikada bir absorbanslar ölçülüp kaydedildi. Absorbansın maksimum ve stabil olduğu zaman aralığı belirlenmeye çalışıldı.

Demir (III) Miktarının Belirlenmesi

Uygun demir hacmini belirlemek için reaksiyon ortamına $1{,}0\times10^{-7}$ M Fe(III) çözeltisinden 0,1-1,0 mL arasında değişen farklı hacimler eklenerek deneme gerçekleştirildi.

H_2O_2 Miktarı Denemesi

H_2O_2 miktarının yöntem üzerinde etkisi olup olmadığını görmek için % 3'lük H_2O_2 çözeltisinden 0,1 ile 1,0 mL arasında değişen farklı hacimler alınarak deney daha önce belirtilen şekilde tekrarlandı.

3.5.5. Seçilen Bireysel Antioksidan Bileşiklere Kullanılan Dört Yöntemin Cevapları

Herbir antioksidanın dört yöntem için sonuçlarını tek bir grafik üzerinde göstermek amacıyla seçilen tüm yönteme uygun olarak kabul edilen konsantrasyon aralıkları belirlendi. Böylece antioksidanların aynı anda hem ROS süpürme ve hem de TAC etkisi ortaya konarak aralarındaki korelasyon incelendi. TAC etkisi CUPRAC ve ABTS/persülfat deneyleri ile ROS süpürme etkisi de (TOC azalması biçiminde) DMPD ve TBARS yöntemleri ile belirlendi. ROS tüketimi ve TAC arasındaki ilişkiyi araştırmak için, ROS sentetik olarak reaksiyon ortamında üretildi. ROS; TBARS yöntemi için Fe(II)-H_2O_2 reaksiyonu yoluyla üretilirken, DMPD ölçümleri için H_2O_2 ile Fe(III)'ün reaksiyonu ile üretildi. Daha sonra seçilen antioksidanların değişen miktarları reaksiyon ortamına ilave edildi.

Yapılan denemelerde, oluşturulan ROS'lar için süpürücü olarak kullanılan antioksidanlar farklı gruplara ayrılabilir; (i) Polifenoller: QR, RT (flavonoller); NG (Flavanon); CFA ve p-CUM (fenolik asitler); CAT ve EC (flavanoller); E vitaminin suda çözünen analoğu olan TR, (ii) İnsan serumu antioksidanları: CYS, GSH, AA, ÜA ve (iii) İnsan serumu.

Seçilen antioksidanların son konsantrasyon aralıkları her dört yönteme aynı anda uygun olacak şekilde; TR ($2{,}0\times10^{-6}$-$1{,}0\times10^{-5}$M), QR ($1{,}0\times10^{-6}$-$5{,}0\times10^{-6}$ M), CAT ($5{,}0\times10^{-7}$-$2{,}6\times10^{-6}$ M), CFA ($1{,}0\times10^{-6}$-$5{,}0\times10^{-6}$ M), EC ($1{,}0\times10^{-6}$-$5{,}0\times10^{-6}$ M) p-CUM ($1{,}0\times10^{-5}$-$5{,}0\times10^{-5}$ M), NG ($1{,}0\times10^{-5}$-$5{,}0\times10^{-5}$ M), RT ($1{,}0\times10^{-6}$-$5{,}0\times10^{-6}$ M), CYS ($1{,}0\times10^{-4}$ - $5{,}0\times10^{-4}$ M), GSH ($1{,}0\times10^{-5}$-$5{,}0\times10^{-5}$ M), AA ($2{,}0\times10^{-5}$-$1{,}0\times10^{-4}$ M), ÜA ($3{,}0\times10^{-6}$-$1{,}6\times10^{-5}$ M) olarak belirlendi.

3.5.6. Sentetik Karışımların Toplam Antioksidan Kapasiteleri ve ROS Süpürme Aktivitelerinin İncelenmesi

Bu dört yöntem antioksidanların her birinin kendine özgü konsantrasyonları ve miktarları sabit tutularak önce ayrı ayrı, sonra da ikili ve üçlü karışımları şeklinde uygulandı. Bu karışımları hazırlamak için Beer yasasına uygun olarak optimum absorbans aralığında kalması amacıyla antioksidan çözeltilerinin en ideal konsantrasyon ve hacimleri aşağıdaki şekilde belirlendi:

DMPD yöntemi için: $1{,}0\times10^{-5}$ M QR (0,4 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CAT (0,6 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA (0,4 mL), $1{,}0\times10^{-3}$ M TR (0,2 mL), $1{,}0\times10^{-3}$ M *p*-CUM (1,0 mL), $5{,}0\times10^{-4}$ M NG (0,2 mL), $5{,}0\times10^{-4}$ M RT (0,4 mL) ve $1{,}0\times10^{-4}$ M EC (0,6 mL).

TBARS yöntemi için : $1{,}0\times10^{-5}$ M QR (0,2 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CAT (0,1 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA (0,2 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M TR (0,2 mL), $0{,}1\times10^{-3}$ M *p*-CUM (1,0 mL), $5{,}0\times10^{-4}$ M NG (0,2 mL), $5{,}0\times10^{-4}$ M RT (0,1 mL) ve $1{,}0\times10^{-4}$ M EC (0,6 mL).

CUPRAC yöntemi için: $1{,}0\times10^{-4}$ M QR (0,1 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CAT (0,3 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA (0,3 mL), $5{,}0\times10^{-4}$ M TR (0,2 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M *p*-CUM (0,6 mL), $5{,}0\times10^{-3}$ M NG (0,6 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M RT (0,4 mL) ve $1{,}0\times10^{-4}$ M EC (0,2 mL).

ABTS yöntemi için: $5{,}0\times10^{-5}$ M QR (0,1 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M CAT (0,1 mL), $5{,}0\times10^{-5}$ M CFA (0,1 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M TR (0,1 mL), $5{,}0\times10^{-3}$ M *p*-CUM (0,1 mL), $1{,}0\times10^{-3}$ M NG (0,1 mL), $1{,}0\times10^{-4}$ M RT (0,1 mL) ve $1{,}0\times10^{-4}$ M EC (0,1 mL).

3.5.7. Seçilen Serum Antioksidanlarının Tek Başlarına ve Serum Örneği Varlığında Toplamsallıklarının İncelenmesi

Serum antioksidanlarından olan sistein (CYS) ve glutatyonun (GSH) hem tek başlarına hem de serum örneği ile standart katkı yapılarak toplam antioksidan kapasiteleri ve ROS süpürme etkileri ölçüldü. Serum kullanılan yönteme göre farklı oranlarda seyreltilerek reaksiyon ortamına eklendi. CUPRAC yöntemi için; 1:5 oranında seyreltilen serum örneğinden 0,3 mL, 10^{-3} M CYS'den 0,2 mL ve 0,5 mL, $5\text{x}10^{-4}$ M GSH'dan 0,2 mL ve 0,5 mL kullanıldı. ABTS yöntemi için; serum 1:50 oranında seyreltilip 0,2 mL, 10^{-4} M CYS 0,2 mL ve 0,5 mL, 10^{-4} M GSH 0,2 mL ve 0,5 mL kullanıldı. DMPD yöntemi için; serum 1:20 oranında seyreltilip 0,2 mL, $5\text{x}10^{-3}$ M CYS 0,2 mL ve 0,5 mL, $5\text{x}10^{-4}$ M GSH 0,2 mL ve 0,5 mL kullanıldı. TBARS yöntemi için; serum 1:5 oranında seyreltilip 0,2 mL, $2\text{x}10^{-2}$ M CYS 0,2 mL ve 0,5 mL, 10^{-3} M GSH 0,2 mL ve 0,5 mL kullanıldı.

3.5.8. İnsan Serumuna TAC ve TOC Yöntemlerinin Uygulanması

Serum Seyreltme Oranlarının İncelenmesi

İnsan serum örnekleri saf su ile farklı oranlarda seyreltilip içinden 0,2 mL kullanılarak DMPD ve TBARS yöntemleriyle ROS süpürme etkileri, CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile de toplam antioksidan kapasiteleri ölçüldü.

TBARS yönteminde TCA ve TBA eklenmesinin ardından 100 °C'de 10 dakika bekletildiğinde serum proteinlerinden kaynaklanan bulanıklık çözeltinin santrifüj edilmesiyle giderildi. Süpernatant fazı alınarak absorbansı ölçüldü. ABTS yönteminde 1:1 ve 1:5 seyreltilmiş serum örneklerinden 0,2 mL eklendiğinde absorbanslar ölçülemedi çünkü oluşan yeşil renk serum eklendiğinde 6 dakikadan önce tamamen kayboldu. Yani 1:1 ve 1:5 seyreltilmiş serum ABTS için çok fazla derişik geldi.

4. BULGULAR

4.1. N,N-DİMETİL-*p*-FENİLENDİAMİN (DMPD) YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

4.1.1. pH Denemesi:

pH denemesi bölüm 3.5.4.1.'de anlatılan şekilde yapıldı. İşlem sonunda referans ve temsili bir süpürücü antioksidan olarak seçilen QR içeren örneklerin absorbansları suya karşı okundu ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de özetlendi. Süpürücü yokluğunda (referans) pH 3,5 ile 5,7 aralığında yapılan denemelerde ölçülen absorbanslar birbirine yakındır. Ancak süpürücü ilave edilerek yapılan denemelerde pH 5,7 haricindeki diğer pH'larda antioksidanlı ve antioksidansız örneklerin absorbansında fark olmadığı gözlendi. Yani süpürücü beklenilen absorbans azalmasına neden olamadı. Süpürücü numune çözeltisinin yokluğunda ve varlığında en büyük absorbans farkı pH 5,7'de sağlandı. Bu nedenle deneylerde en uygun olan pH 5,7 asetat tampon çözeltisi kullanıldı.

Tablo 4.1: pH denemelerinin süpürücü yokluğunda ve varlığındaki absorbansları

pH	Referans Absorbans	QR'li Absorbans
3,5	1,0390	1,1003
4,0	1,1810	1,4006
4,5	1,1776	1,1109
5,0	1,2328	1,1279
5,5	1,1149	0,9219
5,7	**1,1600**	**0,8072**

4.1.2. Zaman Denemesi

Bölüm 3.5.4.1.'de belirtilen şekilde yapılan ölçüm sonuçları Tablo 4.2. de toplandı. 20. dakikaya kadar absorbansın yükselmiş, 20 ile 35 dakika zaman aralığında maksimum

değere ulaşarak neredeyse sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle denemelerde reaksiyon karışımı termostatlı su banyosunda 20 dakika bekletildikten sonra absorbans ölçümlerin yapılmasına karar verildi.

Tablo 4.2: DMPD yönteminin 1saat boyunca absorbans değişimi

Zaman (dakika)	Referans Absorbans
5	0,7861
10	1,0384
15	1,2254
20	**1,3045**
25	**1,3290**
30	**1,3194**
35	**1,3000**
45	1,2282
60	1,1264

4.1.3. Demir (III) Miktarının Belirlenmesi

Bölüm 3.5.4.1.'de anlatılan şekilde yapılan denemelerin sonuçları Tablo 4.3'de gösterildi. Denemeler sonucunda 0,25 mL'den daha büyük hacimlerdeki absorbans değerleri birbirlerine çok yakındır. Bu yüzden daha sonraki denemeler için 0,25 mL Fe(III) çözeltisi seçildi.

Tablo 4.3: Demir (III) miktarının referans absorbansına etkisi

Demir Miktarı (mL)	Referans Absorbans
0,10	0,8582
0,25	1,1467
0,50	1,1764
0,75	1,1788
1,00	1,1775

4.1.4. H_2O_2 Miktarı Denemesi

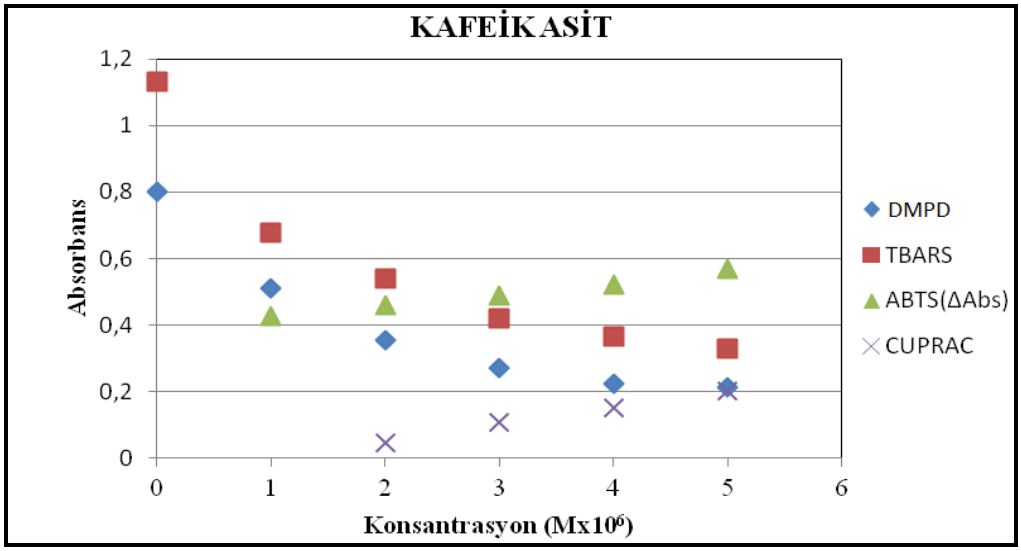
Bölüm 3.5.4.1.'de anlatılan şekilde yapılan denemelerin sonucu Tablo 4.4'de toplandı. Eklenen H_2O_2 miktarlarından 0,10 mL ile 0,5 mL arasında neredeyse hiç fark olmadığı, 0,75 mL'den sonra ise referansın absorbansında hafif bir düşme olduğu saptandı. Denemeler sonucunda H_2O_2 miktarının sonuçlar üzerinde büyük bir etkisinin olmadığı görüldü ve denemelerde H_2O_2 çözeltisinden 0,5 mL kullanıldı.

Tablo 4.4: H_2O_2 miktarının referans absorbansına etkisi

H_2O_2 Miktarı	**Referans Absorbans**
0,10 mL	1,1443
0,25 mL	1,1530
0,50 mL	**1,1588**
0,75 mL	1,1017
1,00 mL	1,0040

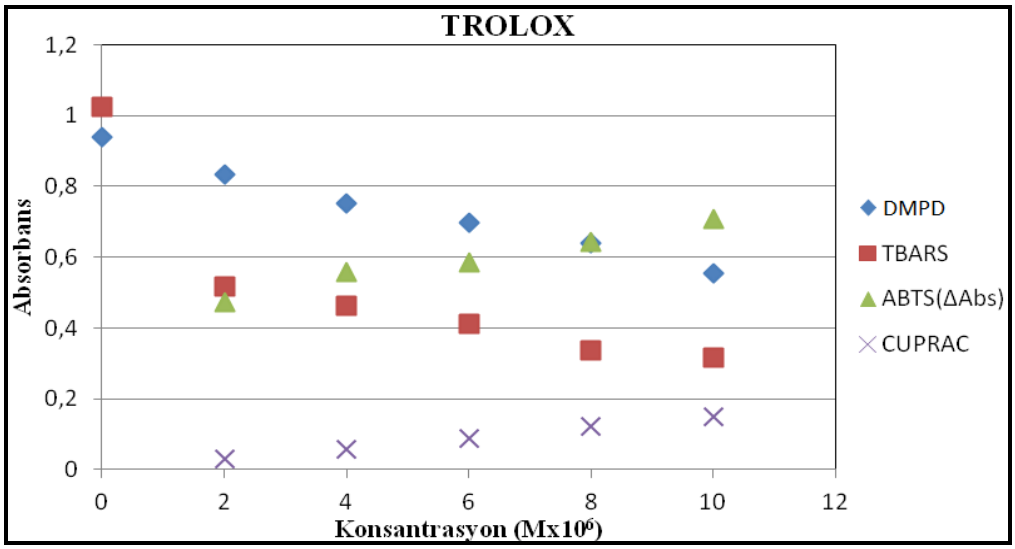
4.2. SEÇİLEN BİREYSEL ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE KULLANILAN DÖRT YÖNTEMİN CEVAPLARI

TAC ve ROS tüketimi arasındaki ilişkinin açıklıkla görülebilmesi için seçilen antioksidanların konsantrasyonlarına bağlı olarak kullanılan her dört yönteme (DMPD, TBARS, CUPRAC ve ABTS) verdikleri cevaplar aşağıdaki konsantrasyon-absorbans grafikleriyle (Şekil 4.1-4.12) gösterildi. Ortama süpürücü olarak eklenen antioksidanların artan miktarları ile CUPRAC ve ABTS (reaktif körü ile örnek arasındaki absorbans farkı dikkate alınmıştır; grafiklerde "ΔAbs" şeklinde gösterilen değerler) ile ölçülen TAC nin arttığı (CUPRAC ve ABTS Yöntemlerine ait absorbans değerlerindeki artış) buna karşılık ROS'un azaldığı (ROS'u ölçen DMPD ve TBARS Yöntemlerindeki absorbans azalması) grafiklerde açıkça görülmektedir.



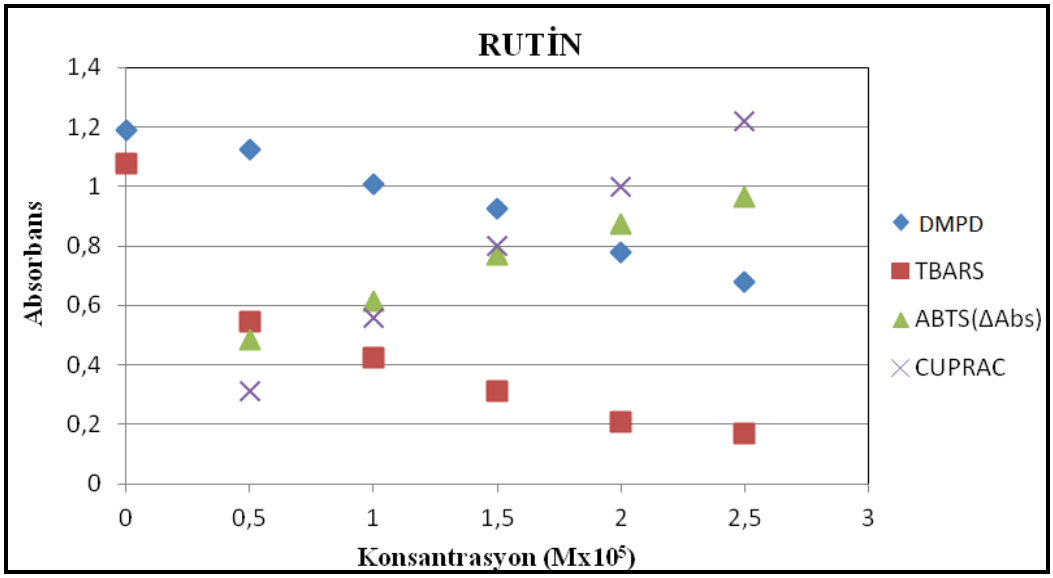
Şekil 4.1: Kafeik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,3234x + 0,8608	R^2 = 0,8212
DMPD için	y = -0,0725x + 0,5319	R^2 = 0,8702
CUPRAC için	y = 0,0507x - 0,0498	R^2 = 0,9947
ABTS için	y = 0,0344x + 0,3914	R^2 = 0,9894



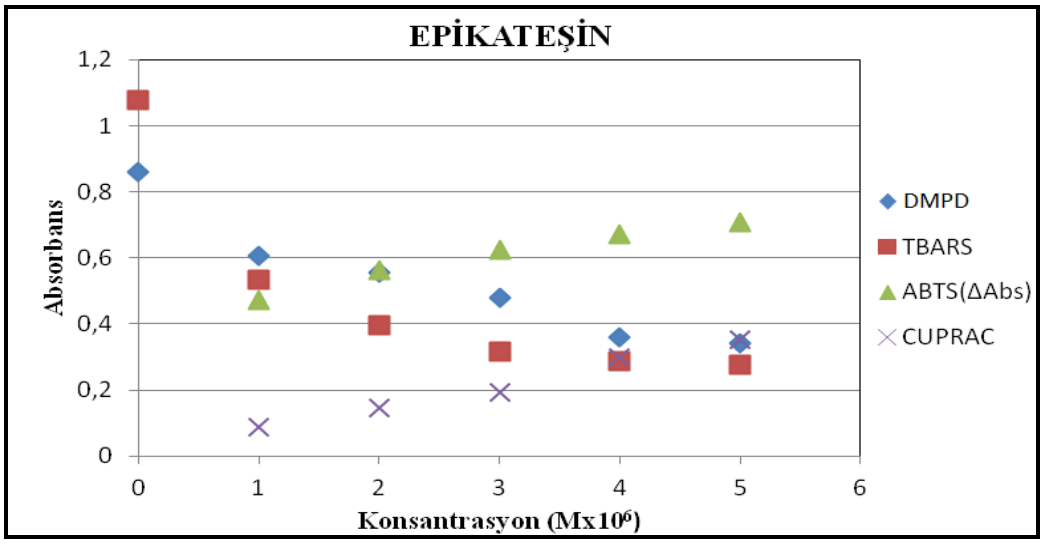
Şekil 4.2: Troloks için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0263x + 0,5668	R^2 = 0,9782
DMPD için	y = -0,0337x + 0,8973	R^2 = 0,9936
CUPRAC için	y = 0,0151x - 0,0008	R^2 = 0,9983
ABTS için	y = 0,0278x + 0,426	R^2 = 0,9813



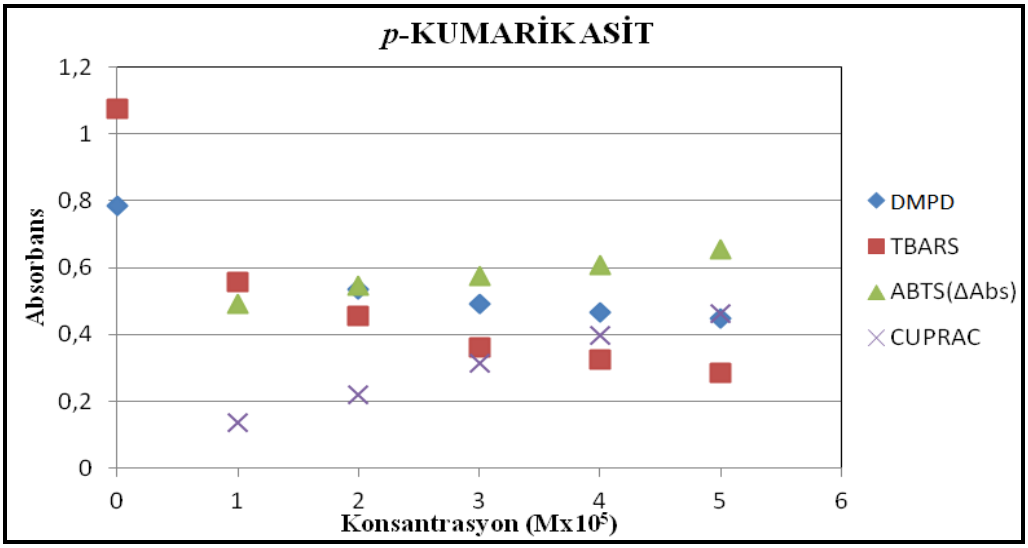
Şekil 4.3: Rutin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,1943x + 0,6242	R² = 0,975
DMPD için	y = -0,2238x + 1,2394	R² = 0,9941
CUPRAC için	y = 0,4509x + 0,1012	R² = 0,9984
ABTS için	y = 0,2445x + 0,3742	R² = 0,9908



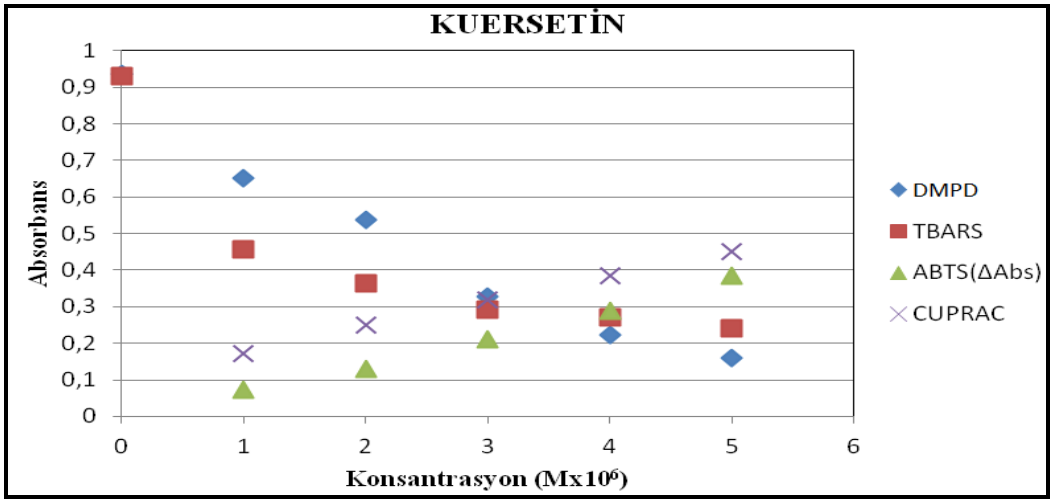
Şekil 4.4: Epikateşin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0626x + 0,5486	R² = 0,8482
DMPD için	y = -0,0726x + 0,6855	R² = 0,9617
CUPRAC için	y = 0,0677x + 0,0125	R² = 0,9839
ABTS için	y = 0,0582x + 0,4336	R² = 0,969



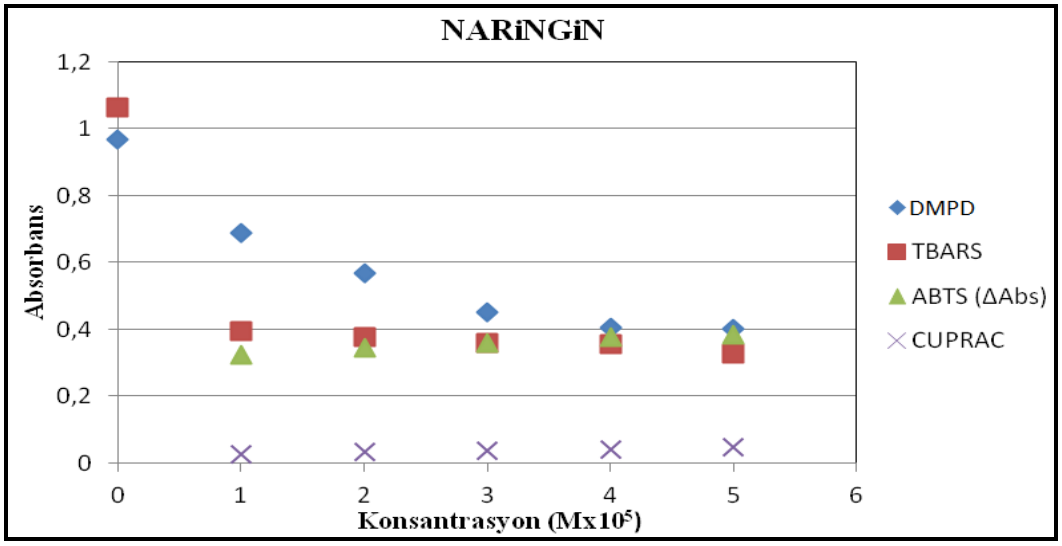
Şekil 4.5: *p*-Kumarik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0675x + 0,5998	R² = 0,9477
DMPD için	y = -0,0323x + 0,6004	R² = 0,9636
CUPRAC için	y = 0,0834x + 0,0557	R² = 0,9965
ABTS için	y = 0,123x + 0,1466	R² = 0,9928



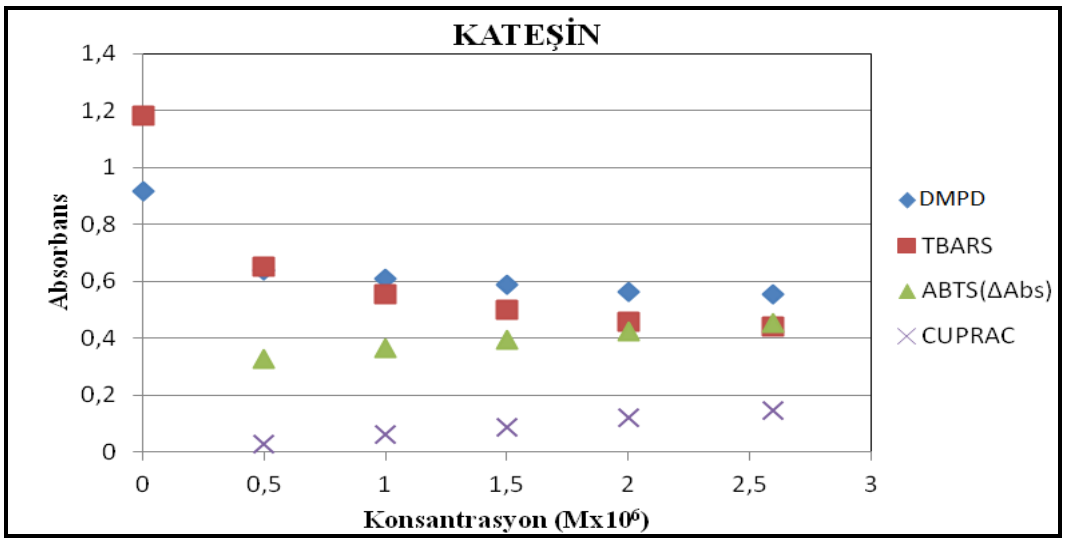
Şekil 4.6: Kuersetin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0523x + 0,4819	R² = 0,9161
DMPD için	y = -0,1298x + 0,7697	R² = 0,967
CUPRAC için	y = 0,084x + 0,0015	R² = 0,9991
ABTS için	y = 0,0785x - 0,0179	R² = 0,9921



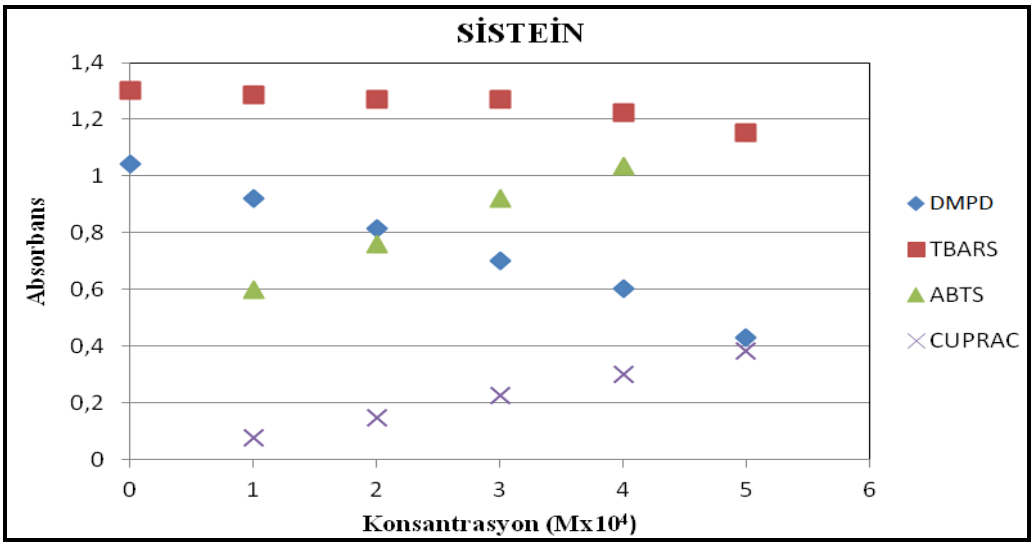
Şekil 4.7: Naringin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0155x + 0,4082	R² = 0,9679
DMPD için	y = -0,1298x + 0,7697	R² = 0,967
CUPRAC için	y = 0,0048x + 0,0224	R² = 0,9986
ABTS için	y = 0,1159x + 0,1097	R² = 0,9997



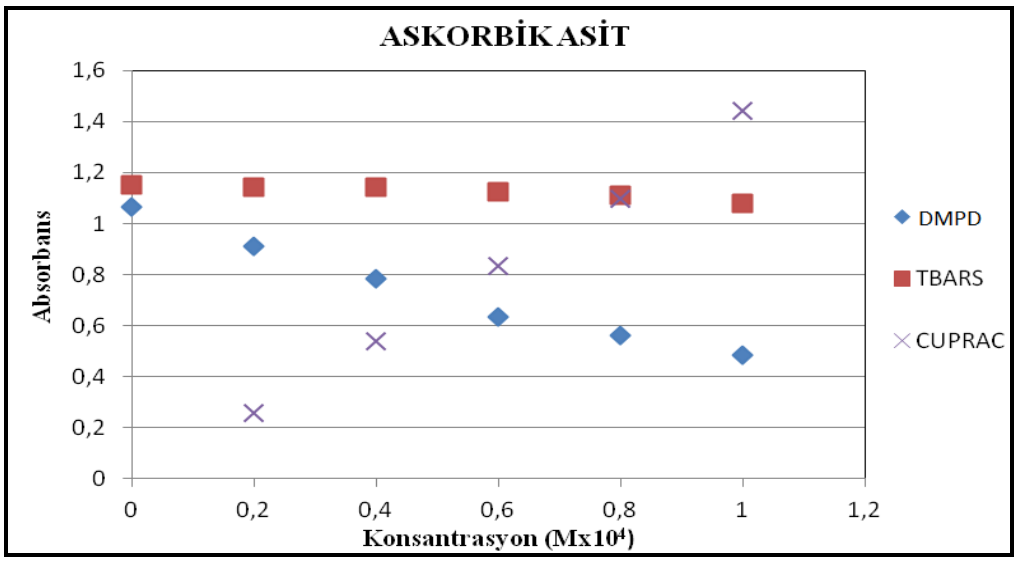
Şekil 4.8: Kateşin için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0978x + 0,6697	R² = 0,9122
DMPD için	y = -0,042x + 0,6537	R² = 0,9645
CUPRAC için	y = 0,0566x + 0,0017	R² = 0,9958
ABTS için	y = 0,0594x + 0,3016	R² = 0,9916



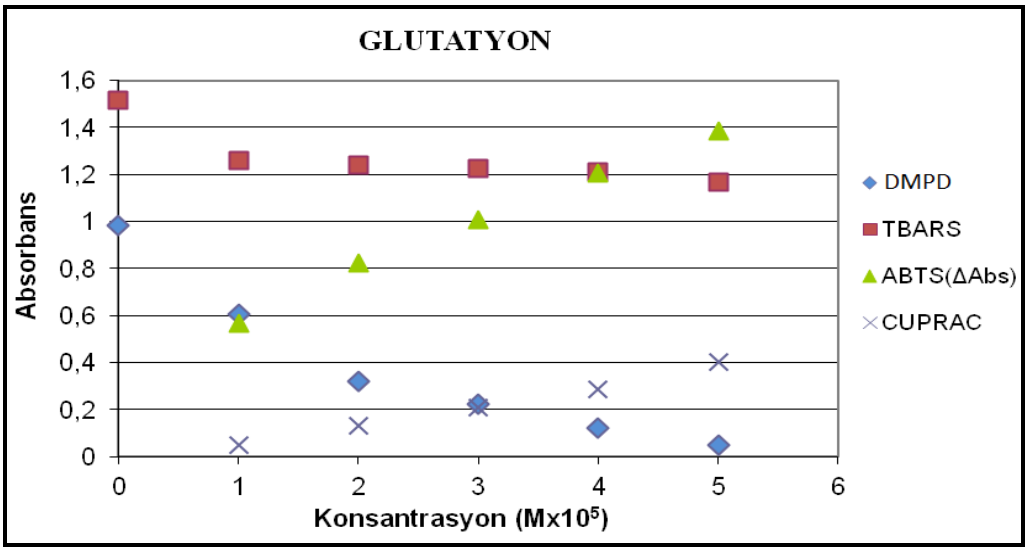
Şekil 4.9: Sistein için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0316x + 1,3351	R^2 = 0,8347
DMPD için	y = -0,1197x + 1,0524	R^2 = 0,9883
CUPRAC için	y = 0,0773x - 0,0054	R^2 = 0,9991
ABTS için	y = 0,1469x + 0,4625	R^2 = 0,9941



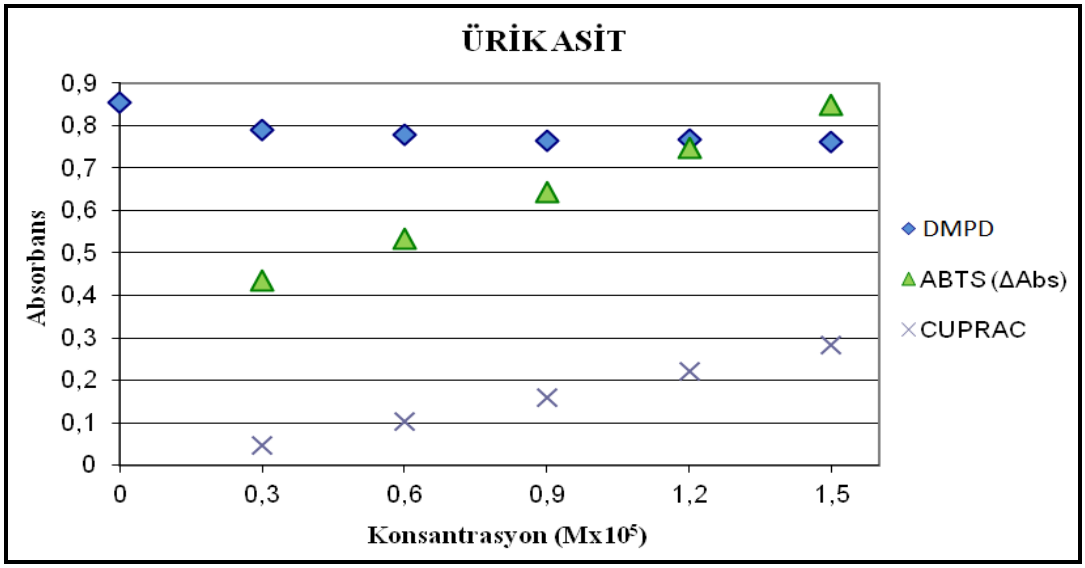
Şekil 4.10: Askorbik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0764x + 1,1664	R^2 = 0,9007
DMPD için	y = -0,535x + 0,9966	R^2 = 0,9767
CUPRAC için	y = 1,4625x - 0,0443	R^2 = 0,9984



Şekil 4.11: Glutatyon için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

TBARS için	y = -0,0208x + 1,282	R^2 = 0,9506
DMPD için	y = -0,1303x + 0,6546	R^2 = 0,9126
CUPRAC için	y = 0,086x - 0,0426	R^2 = 0,9929
ABTS için	y = 0,2016x + 0,393	R^2 = 0,9957



Şekil 4.12: Ürik Asit için dört yöntemin konsantrasyona karşı absorbans (mol.L^{-1}) eğrileri

DMPD için	y = -0,0226x + 0,7932	R^2 = 0,8452
CUPRAC için	y = 0,1955x - 0,0136	R^2 = 0,9991
ABTS için	y = 0,3479x + 0,3283	R^2 = 0,9998

4.3. SENTETİK KARIŞIMLARIN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE ROS SÜPÜRME AKTİVİTELERİ

Bölüm 3.5.4.3.'de açıklanan şekilde yapılan denemelerin sonuçları Tablo 4.5-4.8'de verildi. Bir karışımı oluşturan bileşenlerin tek tek absorbanslarından, absorbansların toplanabilirliği prensibi kullanılarak, karışımın teorik (beklenen) absorbans değerleri hesaplandı ve deneysel sonuçlar ile birlikte verildi. Antioksidanların araştırıldığı birçok literatür kaynaklarında da belirtildiği gibi ikili ve üçlü karışımların absorbansları CUPRAC yöntemi için mükemmel bir toplanabilirliğe sahipken ABTS için de ikili karışımların hemen hemen iyi bir toplamsallığa sahip olduğu bulundu. Ancak üçlü karışımlar için beklenen toplamsallık elde edilemedi.

Tablo 4.5: İkili Karışımların CUPRAC Yöntemi Sonuçları

Antioksidanlar	**Absorbans (deneysel)**	**Absorbans (teorik)**	**% Hata**
QR	0,1990	-	-
CAT	0,3942	-	-
p-CUM	0,2450	-	-
RT	0,5144	-	-
EC	0,2697	-	-
TR	0,2972	-	-
NG	0,4035	-	-
CFA	0,2989	-	-
QR + CAT	0,5729	0,5932	3,42
QR + *p*-CUM	0,4221	0,4440	4,93
RT + EC	0,7588	0,7841	3,22
CFA + TR	0,6025	0,5961	-1,07
NG + EC	0,6731	0,7002	3,87
CFA + CAT	0,7034	0,6931	-1,48
RT + p-CUM	0,7431	0,7594	2,14

Tablo 4.6: İkili Karışımların ABTS/persülfat Yöntemi Sonuçları

Antioksidanlar	**ΔAbsorbans (deneysel)**	**ΔAbsorbans (teorik)**	**% Hata**
QR	0,4585	-	-
CAT	0,5805	-	-
p-CUM	0,6035	-	-
RT	0,4367	-	-
EC	0,5647	-	-
TR	0,4140	-	-
NG	0,3828	-	-
CFA	0,4323	-	-
QR + CAT	0,9514	1,0390	8,43
QR + *p*-CUM	0,9557	1,0620	10,00
RT + EC	0,9571	0,8463	-13,09
CFA + TR	0,9608	1,0128	5,13
NG + EC	0,8549	0,9475	9,77
CFA + CAT	0,9541	1,0128	5,79
RT + p-CUM	0,9673	1,0402	7,00

Tablo 4.7: İkili Karışımların DMPD Yöntemi Sonuçları

Antioksidanlar	**Absorbans (deneysel)**	**Absorbans (teorik)**	**% Hata**
Referans (antioksidansız)	0,8884	-	-
QR	0,7514	-	-
CAT	0,6698	-	-
p-CUM	0,6874	-	-
RT	0,5696	-	-
EC	0,6570	-	-
TR	0,7166	-	-
NG	0,6151	-	-
CFA	0,5527	-	-
QR + CAT	0,4988	0,5328	6,38
QR + *p*-CUM	0,6340	0,5504	-15,18
RT + EC	0,4599	0,3382	-35,98
CFA + TR	0,2850	0,3809	25,17
NG + EC	0,4103	0,3837	6,93
CFA + CAT	0,4623	0,3341	-38,37
RT + p-CUM	0,4229	0,3686	-14,73

Tablo 4.8: İkili Karışımların TBARS Yöntemi Sonuçları

Antioksidanlar	Absorbans (deneysel)	Absorbans (teorik)
Referans (antioksidansız)	0,9963	-
QR	0,5885	-
CAT	0,6195	-
p-CUM	0,4676	-
RT	0,4299	-
EC	0,5204	-
TR	0,5419	-
NG	0,5211	-
CFA	0,4143	-
QR + CAT	0,3205	0,2117
QR + *p*-CUM	0,1573	0,0598
RT + EC	0,2236	0,0460
CFA + TR	0,3307	0,0401
NG + EC	0,1491	0,0452
CFA + CAT	0,2411	0,0375

4.4. İNSAN SERUMUNA TAC VE TOC YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI

4.4.1. Serum Seyreltme Oranlarının Sonuçları

Serum antioksidanlarının ROS süpürme etkileri ve toplam antioksidan kapasiteleri serum seyreltildikçe Tablo 4.9'da görüldüğü gibi azalmıştır.

Tablo 4.9: Dört yöntem üzerinde serumun seyreltme etkisi

Seyreltme Oranı	DMPD Absorbans	TBARS Absorbans	CUPRAC	ABTS ΔAbsorbans
Referans	0,8850	1,0295	-	1,1967
1:1	0,1886	0,3280	0,6290	-
1:5	0,2591	0,6705	0,2336	-
1:10	0,4038	0,8578	0,0940	0,8594
1:20	0,5073	1,0196	0,0474	0,6855

4.4.2. Seçilen Serum Antioksidanlarının Tek Başlarına Ve Serum Örneği Varlığında Toplamsallıklarının İncelenmesi

Bir karışımı oluşturan bileşenlerin toplam absorbansının ideal halde tek tek absorbanslarının toplanabilir olması prensibine uyması beklentisiyle, karışımın deneysel ölçüm absorbansları teorik (beklenen) absorbans değerleri ile birlikte her dört yöntem için ayrı ayrı tablolar halinde verildi. (Tablo 4.10-4.13). Tablolardaki verilerden her dört yönten için sonuçlar karşılaştırıldığında CUPRAC yöntemi için karışımların absorbanslarının mükemmel bir toplamsallığa sahip olduğu belirlendi.

Tablo 4.10: CUPRAC yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı

Antioksidan ve Karışımları	Absorbans (deneysel)	Absorbans (teorik)	% Hata
0,2 mL CYS	0,3245	-	-
0,5 mL CYS	0,7957	-	-
0,2 mL GSH	0,1523	-	-
0,5 mL GSH	0,3754	-	-
0,3 mL serum	0,1888	-	-
0,2 mL CYS + 0,3 mL serum	0,4945	0,5133	3,66
0,5 mL CYS + 0,3 mL serum	0,9679	0,9845	1,68
0,2 mL GSH+ 0,3 mL serum	0,3186	0,3411	6,59
0,5 mL GSH + 0,3 mL serum	0,5350	0,5642	5,17
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH	0,4692	0,4768	1,59
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH + 0,3 mL serum	0,6448	0,6580	2,00

Tablo 4.11: ABTS yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı

Antioksidan ve Karışımları	**ΔAbsorbans (deneysel)**	**ΔAbsorbans (teorik)**	**% Hata**
0,2 mL CYS	0,2876	-	-
0,5 mL CYS	0,5021	-	-
0,2 mL GSH	0,3219	-	-
0,5 mL GSH	0,5987	-	-
0,2 mL serum	0,2552	-	-
0,2 mL CYS + 0,2 mL serum	0,4797	0,5422	11,52
0,5 mL CYS + 0,2 mL serum	0,6938	0,7573	8,38
0,2 mL GSH+ 0,2 mL serum	0,5239	0,5771	9,21
0,5 mL GSH + 0,2 mL serum	0,6985	0,6545	-6,72
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH	0,546	0,6095	10,41
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH + 0,2 mL serum	0,6071	0,8647	29,79

Tablo 4.12: DMPD yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı

Antioksidan ve Karışımları	**Absorbans (deneysel)**	**Absorbans (teorik)**	**% Hata**
Referans (antioksidansız)	1,1094	-	-
0,2 mL CYS	1,0391	-	-
0,5 mL CYS	0,9309	-	-
0,2 mL GSH	1,0467	-	-
0,5 mL GSH	0,7662	-	-
0,2 mL serum	0,5876	-	-
0,2 mL CYS + 0,2 mL serum	0,5511	0,5173	-6,53
0,5 mL CYS + 0,2 mL serum	0,3818	0,4091	6,67
0,2 mL GSH+ 0,2 mL serum	0,4828	0,5249	8,02
0,5 mL GSH + 0,2 mL serum	0,2146	0,2444	12,19
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH	1,0080	0,9764	-3,23
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH + 0,2 mL serum	0,6089	0,4862	-25,23

Tablo 4.13: TBARS yöntemiyle serum antioksidanlarına serum örneğinin katkısı

Antioksidan ve Karışımları	Absorbans (deneysel)	Absorbans (teorik)	% Hata
Referans (antioksidansız)	1,1448	-	-
0,2 mL CYS	1,1273	-	-
0,5 mL CYS	0,9509	-	-
0,2 mL GSH	1,0734	-	-
0,5 mL GSH	1,0316	-	-
0,2 mL serum	0,9363	-	-
0,2 mL CYS + 0,2 mL serum	0,8789	0,9188	4,34
0,5 mL CYS + 0,2 mL serum	0,6669	0,7424	10,16
0,2 mL GSH+ 0,2 mL serum	0,9436	0,8649	-9,09
0,5 mL GSH + 0,2 mL serum	0,9028	0,8231	-9,68
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH	1,1410	1,0559	-8,05
0,2 mL CYS + 0,2 mL GSH + 0,2 mL serum	0,8043	0,9325	13,74

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bulgular kısmında Şekil 4.1 ve 4.12 arasında gösterilen grafiklerde görüldüğü gibi CUPRAC ve ABTS/perülfat (referans ile örnek arasındaki fark ABTS'nin absorbansı olarak hesaba katıldı) yöntemlerinde absorbans değerleri antioksidanların artan miktarlarıyla artmıştır. Çalışılan tüm antioksidanların en yüksek doğrusal korelasyon katsayılarının (r^2 > 0,99) CUPRAC yöntemi ile elde edildiği görülmüştür. Bununla birlikte, DMPD ve TBARS yöntemlerinde ise serbest radikal miktarı ortam içindeki antioksidan miktarının artması ile azalmış ve serbest radikallerin miktarını gösteren absorbans değerlerinde de azalma gözlenmiştir. Bu azalma DMPD için neredeyse doğrusal iken TBARS için ise doğrusallıktan sapma göstermiştir. TBARS yöntemi için, en yüksek korelasyon katsayıları RT ve TR için (r^2 ~ 0,97-0,98), sonra QR, CAT, CFA ve *p*-cum için (r^2 ~ 0,92-0,95) olmasına rağmen CYS, NG, AA, GSH ve ÜA için doğrusal olmayan şekildedir. Çünkü bu antioksidanların deney ortamındaki konsantrasyonlarının artmasına rağmen absorbanslarında çok az bir değişiklik meydana gelmiştir. DMPD yöntemi için, RT istisnası ile (r^2 ~ 0,87) sonuçlar çoğu antioksidan için eğriseldir (r^2 ~ 0,95 veya daha yüksek). DMPD absorbans değerleri her konsantrasyon için antioksidanlar ile homojen bir azalma sergilemiştir ama ÜA için çok az bir azalma elde edilmiştir.

Ayrıca AA ve ÜA için aynı grafik üzerinde tüm yöntemleri göstermek için tam olarak uygun bir konsantrasyon aralığı belirlenememiştir. AA analizlerinde DMPD, TBARS ve CUPRAC yöntemleri için ortak uygun aralık ($2{,}0\times10^{-5}$-$1{,}0\times10^{-4}$ M) olup bu konsantrasyonlar ABTS yöntemi için oldukça derişik gelmiştir. ÜA ölçümlerinde, CUPRAC, ABTS ve DMPD yöntemleri ($3{,}0\times10^{-6}$-$1{,}6\times10^{-5}$ M) konsantrasyon aralığında uygulanmış ancak referans ve ÜA örnekleri arasında bu konsantrasyonlarda anlamlı absorbans farkı TBARS yöntemi için gözlenememiştir.

Eklenen antioksidanların artan konsantrasyonları ile birlikte TAC'nin buna bağlı olarak da ROS tüketimi de artmıştır. Denemeler sonucunda elde edilen veriler eklenen antioksidanların TAC'ı ile TOC'un azalması arasında bir eğrisel ilişki olduğunu göstermiştir. Gerçek bir örnek olarak, doğal antioksidanlar açısından zengin olduğu bilinen insan serumu, beklenen şekilde iyi bir ROS süpürücü aktivite göstermiştir. Serum örneklerinin artan seyreltmeleri ile TAC ve buna bağlı olarak ROS süpürücü aktivitesi azalmıştır. TBARS deneyinde bazı antioksidanlar (sistein, askorbik asit kısmen, ve ürik asit tamamen) için beklenen yanıtlar elde edilememiştir. Aynı şekilde TBARS sonuçlarının toplamsallık ve tekrarlanabilirlikleri oldukça kötüdür. Oksidatif dönüşüm deneylerinde ikincil ürünlerin (MDA) oluşumu birincil ürünlerin oluşumundan daha karmaşık bir dizi reaksiyonlar (ardışık ve paralel reaksiyonlar) içerir ve TBARS deneyi MDA'dan başka birçok bileşik için seçici olmayan sonuçlar vermektedir. Bu nedenle oksidasyonun azalmasının konsantrasyon-bağımlı yanıtlarının DMPD testi sonuçlarına TBARS testinden daha iyi yansıdığı düşünülmüştür.

TOC yöntemlerinde toplamsallık olmaması ile ilgili olarak bu veriler DMPD ve TBARS yöntemlerinin eğrilerinin kısmen doğrusal olan eğrisel karakterleri ile uyumludur çünkü antioksidan karışımlarının absorbanslarının toplamsallığı ancak Beer kanununa uygunluk ile sınırlıdır.

İkili karışımlarda teorik sonuçlar deneysel olan sonuçlardan DMPD yöntemi için biraz ve TBARS yöntemi için önemli ölçüde sapmış olduğu belirlenmiştir. Üçlü karışımlarda ise bu iki yöntem için sonuçlar beklenen sonuçlardan çok büyük ölçüde sapmış olduğu görülmüştür. Yine de kullanılan antioksidan karışımları aynı derişimde tek başlarına antioksidanlardan daha fazla ROS tükettiğini göstermiştir.

TBARS/MDA testi lipid peroksidasyonunda en sık kullanılan belirteç olmasına rağmen vücut sıvılarındaki geçerliliği tartışılmaktadır.

TBARS Yöntemi için listelenen dezavantajlar dikkate alındığında, antioksidanlar tarafından gerçekleştirilen ROS tüketiminin DMPD testinde daha iyi yansıtıldığı saptanmıştır. Oksidatif strese maruz biyolojik sıvılar için, test edilen antioksidanların

TAC'ı CUPRAC yöntemi ile ve ROS tüketimi de DMPD testiyle ölçülebilir. Bu çalışmada eklenen antioksidan konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak TAC'daki artış ve TOC'daki azalışın mutlak değerleri arasında eğrisel bir ilişki biçiminde antioksidan kapasite ve oksidatif dönüşüm arasında ters bir ilişki kurulmuştur. Bu basit ilişki esas olarak TOC sonuçlarına dayanan tibbi biyoanaltik kimya ile genellikle TAC sonuçlarını kullanan gıda analitik kimya arasında bir köprü oluşumunu başlatabilir çünkü bu iki dal birbirinden oldukça farklı diller kullanmaktadır. Böylece serum antioksidan kapasitesinin duyarlı ve kesin olarak ölçülmesinin, hastalıkların teşhisinde ve tedavi sürecinin izlenmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. MACHLIN, L.J., BENDICH, A.,1987, Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, *FASEB*, 1, 441-445.
2. FANG, Y. Z., SHENG, Y., WU, G., 2002, Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition*, Nutrition,* 18, 872-879.
3. FU, W., CHEN, J., CAI, Y., LEI, Y., CHEN, L., PEI, L., ZHOU, D., LIANG, X., RUAN, J., 2010, Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from Parathelypteris nipponica (Franch. et Sav.) Ching, *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 521–528.
4. VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
5. KOPÁNI, M., CELEC, P., DANIŠOVIČ, L., MICHALKA, P., BIRÓ, C., 2006, Oxidative stress and electron spin resonance, *Clinica Chimica Acta*, 364, 61-66.
6. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press*, Oxford, 2007.
7. SHAHIDI, F., 1996, Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, *AOCS Press*, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
8. BEKTAŞOĞLU, B.,2007, *Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünde yeni bir yöntem geliştirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
9. CROSS, C. E., HALLIWELL, B., BORISH, E. T., 1987, Oxygen radicals and human disease, *Ann.Int.Med.,* 107, 526-545.
10. GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C., 2000, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data, *Free Radical Biology & Medicine,* 29(11), 1106-1114.
11. MEISTER, A., ANDERSON, M. E. , 1983, Glutathione, *Annu Rev Biochem*., 52, 711-760.

12. KORACEVIC, D., KORACEVIC, G., DJORDJEVIC, V., ANDREJEVIC, S., COSIC, V., 2001, Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids, *J. Clin Pathol*, 54, 356–361.
13. ERDAL N., ALTUNKAYNAK Y., ALTUNKAYNAK E., ÖZTÜRK M., MUTLUAY B., KÖKSAL A., BAYBAŞ S., 2005, Migrenli hastalarda oksidatif stresin göstergesi olarak lipid peroksidasyonunun incelenmesi, *Düşünen Adam*, 18(3), 129-135.
14. KISHIKAWA, N., OHYAMA, K., YAO, J., MIYAMOTO, A., IMAZATO, T., UEKI, Y., NAKASHIMA, K., MAEHATA, E., KURODA, N., 2010, Automated analysis of the serum antioxidative activities against five different reactive oxygen species by sequential injection system with a chemiluminescence detector, *Clinica Chimica Acta*, 411, 1111–1115.
15. BAŞKOL M., BAŞKOL G., KOÇER D., ARTIŞ T., YILMAZ Z., 2007, Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbiriyle ilişkileri, *Türk Klinik Biyokimya Dergi*; 5(3), 83-89.
16. NIETO, F. J, IRIBARREN, C., GROSS, M. D., COMSTOCK, G. W., CUTLER, R. G, 2000, Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? Atherosclerosis, *Elsevier*, 148, 131–139.
17. KELEŞTEMUR, G. T., ÖZDEMİR, Y., 2011, Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres*, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* 4(1), 69-73.
18. MERCAN, U., 2004, Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2), 91-96.
19. CHEESEMAN, K. H., SLATER, T. F., 1993, An introduction to free radical biochemistry, *Bio.Med.Bull.* , 49, 481-493.
20. AKÇA, A., 2012, *Biber çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri ve bileşenleri açısından değerlendirilmesi,* Yüksek lisans tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
21. CASH, T. P., PAN, Y., SIMON, M. C., 2007, Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing, *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 1219–1225.
22. VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.

23. AFONSO, V., CHAMPY, R., MITROVIC, D., COLLIN, P., LOMRI, A., 2007, Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases, *Joint Bone Spine,* 74, 324-329.
24. GUTTERIDGE, J. M. C., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomakers of tissue damage, *Clin. Chem*.,41, 1819-1828.
25. KARA, N., 2011, *Serumda toplam antioksidan kapasitenin modifiye cuprac (bakır(ıı) indirgeme esaslı antioksidan kapasite) metoduyla belirlenmesi*, Yüksek lisans tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
26. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation, *analytica chimica acta*, 616, 196–206.
27. ARDESTANI, A., YAZDANPARAST, R., 2007, Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts, *Food Chemistry*, 104, 21–29.
28. MEMİŞOĞULLARI, R., 2005, Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
29. REITER, R. J., Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain, *Faseb. J.*, 9, 526-533.
30. YILDIZ, L., BAŞKAN, K., TÜTEM, E., APAK, R., 2008, Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and netle, *Talanta*, 77, 304–313.
31. CAO, G., PRIOR, R. L., 1999, The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in Enzymology* 299, 50-62.
32. RATNAM, D. V., ANKOLA, D.D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D.K., KUMAR, M.N.V. R., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release,* 113, 189–207.
33. ÖZYÜREK, M., 2009, *Reaktif oksijen türleri süpürücü antioksidan aktivitenin ölçümünde modifiye cuprac yöntemlerinin geliştirilmesi*, doktora tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

34. ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (4), 652-664.
35. ALTINIŞIK, M., *Kan Plazması Ve Serumun Kompozisyonu* [online], Anadolu Üniversitesi, www.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1211/unite05.pdf [Ziyaret Tarihi: 3 Aralık 2012].
36. *Kan Fizyolojisi* [online], Anadolu Üniversitesi, www.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1211/unite05.pdf, [Ziyaret Tarihi: 5 Aralık 2012].
37. ÖZTÜRK, M., GÜZELHAN, Y., SAYAR, K., TÜZÜN, Ü., 2001, Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması, *Klinik Psikofarmokoloji Bülteni*, 11, 155-159.
38. KARAPEHLİVAN, M., UZLU, E., ATAKİŞİ, O., ERDOĞAN, H. M., UZUN, M., ÇİTİL, M., 2007, Doksorubisin uygulanan tavşanlarda plazma sialik asit, malondialdehit ve redükte glutatyon düzeylerine l-karnitinin etkileri, *Kafkas Üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 13 (2),155-160.
39. ALTINTAŞ, S., 2006, *Kahramanmaraş'ta bazı iş kollarında çalışan boya işçilerinde plazma ve eritrosit membranı sialik asit, glutatyon, plazma nitrik oksit ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin değerlendirilmesi,* Yüksek lisans tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
40. AKTAŞ, M., DEĞİRMENCİ, U., ERCAN, S., TAMER, L., ATİK, U., 2005, Redükte glutatyon ölçümünde hplc ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 3(3), 95-99.
41. LIPPI, G., MONTAGNANA, M., FRANCHINI, M., FAVALORO, E. J., TARGHER, G., 2008, The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease, *Clinica Chimica Acta*, 392, 1–7.
42. İPEK, E., YOLCU, M., YAŞAR, A., KASAPKARA, H. A., YÜKSEL, İ. Ö., ALİ, S., BİLGE, M., 2012, Koroner arter hastalığı ve metabolik sendromu olan hastalarda serum ürik asit düzeylerinin koroner tımı kare sayıları üzerine etkisi, *TGKD*, Cilt 16, Sayı 1, 9-11.
43. ROCH-RAMEL, F., GUISAN, B., 1999, Renal Transport of Urate in Humans, *News Physiol Sci*, 14, 80-4.

44. GÜRSOY, Ş., 2008, *Düzenli spor yapan öğrenci gruplarında egzersizin total antioksidan kapasite ve serum lipit profili üzerine etkisi*, doktora tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
45. HIRAYAMA, K., UNOHARA, N., 1988, Spectrophotometric catalytic determination of an ultratrace amount of iron(III) in water based on the oxidation of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine by hydrogen peroxide, *Anal. Chem*., 60, 2573-2577.
46. PIHLANTO, A., 2006, Antioxidative peptides derived from milk proteins, *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
47. GUTTERIDGE, J.M.C., 1987, Ferrous salt promoted damage to deoxyribose and benzoate, *Biochemical Journal*, 243, 709-714.
48. BEKTAŞOĞLU, B., ÖZYUREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPL*C*, *Talanta*, 77, 90–97.
49. CHUN, O. K., KIM, D., LEE, C. Y., 2003, Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums, *J. Agric. Food Chem.,* 51, 8067-8072.
50. RIVERO-PEÄ REZ, M. D., MUNIZ, P., GONZAÄ LEZ-SANJOSEÄ, M. L., 2007, Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies, *J. Agric. Food Chem,*. 55, 5476-5483
51. SANCHEZ-MORENO, C., 2002, Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International,* 8, 121-139.
52. ÖZTAN, T., 2006, *Mor havuç konsantresi, şalgam suyu, nar suyu ve nar ekşisi ürünlerinde antioksidan aktivitesi tayini ve fenolik madde profilinin belirlenmesi,* yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü.
53. ALBAYRAK, S., SAĞDIÇ, O., AKSOY, A., 2010, Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 26(4), 401-409.
54. HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.,* 53, 1841-1856.

55. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C., "Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay ", *Free Radical Biol. Med*., 26 (1999) 1231.
56. PRIOR, R. L., WU, X., SCHAICH, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem*., 53, 4290-4302.
57. GÜLÇİN, İ., 2010, Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight, *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 11, 210–218.
58. SAÂNCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J. A., SAURA-CALIXTO, F., 1999, Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International*, 32, 407- 412.
59. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, Novel total antioxidant ındex for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability ın the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
60. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E. and M. ALTUN, 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)- neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39, 949-961.
61. DEMİRCİ ÇEKİÇ, S., SÖZGEN BAŞKAN, K., TÜTEM, E. and APAK, R., 2009, Modified cupric reducing antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols, *Talanta,*79, 344-351.
62. 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, *Analytıcal Bıochemıstry,* 239, 70–76.

ÖZGEÇMİŞ

01.09.1986 yılında İstanbul'da doğdum. 1992 yılında başladığım ilköğrenimimi Emin Ali Yaşın İlköğretim ve Çapa Atatürk İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra 2000 yılında Kocamustafapaşa Lisesi' nin yabancı dil ağırlıklı bölümünde öğrenim gördüm. Lise öğreniminin ardından 2005 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım. 4 yıllık üniversite öğrenimini tamamlayıp 2009 yılında mezun oldum. 2010 yılı bahar döneminde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimine başladım.