T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ACANTHUS HIRSUTUS 'UN ASETON ÖZÜTÜNÜN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevilay GÜNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz -2014

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Sevilay GÜNER

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ACANTHUS HIRSUTUS 'UN ASETON ÖZÜTÜNÜN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevilay GÜNER

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

2014, 48 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Doç. Dr. Murad Aydın ŞANDA
Doç. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Acanthus hirsutus Anadolu geleneksel halk hekimliğinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada *A. hirsutus*'un aseton ekstraktının antioksidan özellikleri; toplam antioksidan, serbest radikal süpürme etkinliği (DPPH testi), β- karoten /linoleik asit metodu, demir ve bakır indirgeme güçlerini içeren farklı kimyasal test sistemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içerikler belirlenmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içerik sırasıyla 51.39 mgGAE/g ve 18.60 mgRE/g olarak tespit edilmiştir. DPPH yönteminde 1mg/ml konsantrasyonda %47.87 etkinlik gözlenmiştir. β-karoten/ linoleik asit test sisteminde,1 mg/ml konsantrasyon linoleik asit oksidasyonu %66.83 oranında inhibe edilmiştir. Demir ve bakır indirgeme güçleri ise konsantrasyona bağlı bir durum sergilemektedir. Bu sonuçlar *A. hirsutus*'un doğal antioksidanların bir kaynağı olarak gıda ve farmakoloji endüstrilerinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Acanthus hirsutus,* Antioksidan, Fenolik içerik, Serbest radikal, Türkiye.

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ACETONE EXTRACT OF *ACANTHUS HIRSUTUS*

Sevilay GÜNER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

2014, 48 Pages

Jury
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Assoc. Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA
Assoc.Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Acanthus hirsutus is used in Anatolian folk medicine for the treatment of various ailments. In the present study, the antioxidant properties of acetone extract obtained from *A. hirsutus* was evaluated by different chemical assays, including total antioxidant, free radical scavenging activity (DPPH method), β-carotene/linoleic acid test system, ferric and cupric reducing power. Total phenolic and flavonoid content were also determined. Total phenolic and flavonoid content were detected as 51.39 mgGAE/g and 18.60 mgRE/g, respectively. The free radical scavenging activity was observed as 47.87% at 1 mg/ml concentration in DPPH method. In B-carotene/linoleic acid system at 1 mg/ml concentration, the extract exhibited 66.83 % inhibition against linoleic acid oxidation. Moreover, the ferric and cupric reducing powers are concentration-dependent manner. The results indicated that *A. hirsutus* can be exploited as a source of natural antioxidants in food and pharmacological industry.

Keywords: *Acanthus hirsutus,* Antioxidant, Phenolic content, Free radical, Turkey.

ÖNSÖZ

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji-Biyokimya Araştırma Laboratuarı'nda yürütülmüş olan bu tez çalışmasında, Türkiye florası için oldukça önemli bir tür olan *Acathus hirsutus*'un antioksidan kapasitesi belirlenmiştir.

Bu tür ile yürütülmekte olan çalışmaların bir bölümünü bana tez olarak veren, bilgileri ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında göstermiş olduğu yardımlarından dolayı Arş. Gör. Gökhan ZENGİN'e ayrıca çok teşekkür ederim. Ve laboratuvar çalışmalarına katkıları olan doktora öğrencisi Şengül UYSAL ile yüksek lisans öğrencisi Ramazan CEYLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince her türlü fedakarlığa katlanan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Sevilay GÜNER
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET **1**

ABSTRACT **2**

ÖNSÖZ **3**

İÇİNDEKİLER **4**

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI **9**

2.1.SERBEST RADİKALLER 9
2.1.1.Süperoksit radikali 13
2.1.2.Hidrojen peroksit 13
2.1.3.Hidroksil radikali 14
2.1.4.Singlet oksijen 14
2.1.5.Nitrik oksit 14
2.2.ANTİOKSİDANLAR 15
2.3.FENOLİK BİLEŞİKLER 19
2.3.1.Fenolik asitler 20
2.3.2.Flavonoidler 20
2.4.Acanthaceae familyası ve *Acanthus hirsutus* 22

3. MATERYAL VE YÖNTEM **26**

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **30**

4.1. Toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan içerik 30
4.2.DPPH serbest radikal süpürme etkinliği 31

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **37**

5.1. Sonuçlar 37
5.2. Öneriler 37

KAYNAKLAR **38**

ÖZGEÇMİŞ **45**

1.GİRİŞ

İnsanlık tarihinin başlangıcından itibaren insanlarla bitkiler arasındaki ilişki incelenmektedir. İnsanlar var olduklarından bu yana yaşamlarını sürdürebilmek için bitkilerden faydalanmışlardır. Eski zamanlarda imkanların kısıtlılığından dolayı insanlar bazı bitkileri besin, boya elde etmek, süs bitkisi olarak ya da tedavi amaçlı kullanmışlardır. Ve bitkilerin kullanımı açısından günümüze ışık tutacak pek çok tecrübe ve birikim taşımışlardır (Savran ve Bağcı, 2002). Bitkilerle insanlar arasındaki ilişki çerçevesinde özellikle bitkilerle tedavi dikkat çekmekte ve bu yönde tıbbi bitkiler üzerinde yoğunlaşılmaktadır. (Kaya, 2010) İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık (seker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb.) bitkiler kullanılarak alternatif bir şekilde tedavi edilebilmektedir (Faydaoğlu, 2011) .Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin miktarı günümüze gelinceye kadar önemli artışlar göstermektedir. Bu sayı Mezopotamya da 250 civarı iken,ortaçağ da 4000 civarında, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı son araştırmalara göre ise günümüzde 20.000 civarındadır (Kalaycıoğlu ve Öner,1994; Ceylan, 1995). 19. ve 20. yüzyıllarda kimya ve biyokimya bilimlerindeki gelişmeler ilaç sanayisine büyük bir ivme kazandırmış, bu sayede etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri benimsenerek analitik, toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu, laboratuvarlarda tıbbın gereksinimlerine yanıt veren pek çok ilaç geliştirilmiştir. Mevcut ilaçların 1/4'inin bitkisel kökenli olduğu bilinmektedir. Yine Dünya sağlık örgütüne göre bitkisel drogların sayısı 1900 olarak ifade edilmekte ve dünyada yaklasık 4 milyar insan (dünya nüfusunun % 80'i) sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalışmaktadır. Son yıllarda sentetik ilaçlarla meydana gelebilen ciddi yan etkilerin yol açtığı medikal ve ekonomik sorunlar göz önünde bulundurulduğunda doğallığın her zaman etkili ve yan etkiden arınmış olduğu düşüncesi gibi bir çok etmene bağlı olarak bitkisel tedavi yeniden popüler duruma gelmiştir (Şarışen ve Çalışkan, 2005) .

Türkiye, 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000'den fazla tür ve tür altı taksonu (alt tür ve varyete) ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (Faydaoğlu,2011; Davis 1985, 1988, Güner ve ark., 2000). Tüm Avrupa kıtasının yaklaşık 12.000 kadar bitki

taksonuna sahip olduğu düşünüldüğünde yurdumuzun bitki örtüsü bakımından nedenli zengin olduğu görülmektedir (Ekim ve ark. 2000). Türkiye'nin ılıman iklim kuşağına, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitliliğine, zengin su kaynaklarına, büyük yükseklik farklılıklarına, çok çeşitli habitat tiplerine sahip olması ile üç fitocografik_bölgenin buluştuğu yerde olması, anadolu'nun doğusu ile batısı arasında ekolojik farklılıklarının bulunması ve buzul çağlarında Anadolu'nun bitkiler için bir sığınak olması floristik açıdan zenginliğinin başlıca sebeplerindendir (İlçım ve ark., 1998). Verilere bakıldığında Türkiye'nin endemizm (Yeryüzünün yalnızca belirli bölgelerinde yayılış gösteren) bakımından da oldukça zengin bir ülke olduğu görülmektedir. Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891' dir. Bu sayıya endemik olan 497 alt türü ve 390 varyeteyi dâhil ettiğimizde toplam endemik takson sayısının 3750'den fazla olduğu görülmektedir (Güner ve ark., 2000). Ancak bu bitki zenginliğinden yeterince faydalanılamamaktadır (İlçim ve ark., 1998). Türkiye florasında bulunan yaklaşık 10.000 bitki türünün ortalama 1000 kadarı genel olarak kullanılmakla birlikte, sadece 400 tıbbi bitki türünün ticaretinin yapıldığı ve tıbbi fayda sağlandığı bilinmektedir. (Kan, 2010) Ülkemizde halen daha incelenmemiş bir çok bitki türü olmakla birlikte, bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal, antikarsinojenik, antitümör, analjesik gibi aktiviteleri üzerindeki laboratuvar çalışmaları devam etmektedir.

Serbest radikaller; aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal bir sonucu olarak oluşan, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir (Perkins, 1995; Halliwell ve Gutterıdge ,1999; Matés ve ark. 1999). Stres, radyasyon ve çevresel ajanlar (pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.) gibi dış etkenlerin de serbest radikal oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Serbest radikallerin en önemlileri süperoksit radikali ($O_2\bullet$-), hidroksil radikali ($\bullet OH$), singlet oksijen ($1O_2$) , hidrojen peroksit (H_2O_2), ve peroksinitrit (ONOO-) dir ve bunlar 'reaktif oksijen türleri (ROT)' adını almaktadırlar (Arıduru ve Arabacı, 2013). ROT'lar organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle oldukça kolay reaksiyona girmekte, bu reaksiyon bir zincir reaksiyon olarak devam etmekte ve mevcut hasar da buna bağlı olarak artış göstermektedir. Bu yüzden de yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, katarakt, diyabet, böbrek ve

karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıktan sorumlu tutulmaktadırlar (Halliwell ve Gutterıdge 1990; Arıduru ve Arabacı, 2013).

Metabolizmanın işleyişi esnasında doğal bir proses olarak meydana gelen bu oksidasyonun gerçekleşmesi sonucunda oluşan serbest radikallerle, organizmada çeşitli hasarlar ortaya çıkması ve bunun kanser gibi birçok hayati öneme sahip kronik hastalıkların başlatıcısı olması, serbest radikallere karşı mücadele eden antioksidan bileşikler üzerine ilgiyi arttırmış ve farmasötik preparatların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmıştır (Wei ve Pang,2005). Antioksidanlar serbest radikallere karşı savunma mekanizması oluşturan bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar bu savunma mekanizmasını; Radikal metabolit üretiminin önleyerek, üretilmiş radikalleri temizleyerek, oluşan hücre haraplanmasını onararak, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarını durdurarak ve endojen antioksidan kapasitenin arttırılmasını sağlayarak gerçekleştirmektedir (Gutteridge,1995). Antioksidanlar; sentetik antioksidanlar ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. BHT, BHA ve PG gibi gıdaların işlenmesinde kullanılan sentetik antioksidanların canlı organizmada kanserojenik etki gösterdiğinin yapılan araştırmalarla tespit edilmesi üzerine doğal antioksidanlar günümüzde oldukça büyük bir önem kazanmıştır. Hem ekonomik açıdan hem de güvenlik açısından daha uygun görülmesi ve son zamanlarda sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanların tercih edilmeye başlanmasından dolayı çalışmalarda doğal antioksidanlar üzerine eğilim artmaktadır. (Namiki, 1990)

Bitkiler içerdikleri sekonder metabolitlerden dolayı iyi bir doğal antioksidan kaynağı olarak bilinmektedir (Khalaf ve ark., 2008). İçerdikleri bu metabolitlerin ana grubu fenolik bileşiklerdir. Bitkilerin fayda sağlayıcı etkilerinin fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, serbest radikalleri bağlamalarından ve hidrojen atomlarını ya da elektronlarını vermesinden ve bazı enzimleri inaktif hale getirmesinden kaynaklanmaktadır (Tsao ve Yang, 2003). Fenolik bileşiklerce zengin gıdaların kalp ve damar hastalıkları, kanser gibi pek çok hastalığı önleyici etki gösterdiği ve yaşlanmayı geciktirme gibi olumlu etkiler yarattığı bilinmektedir (Aviram ve ark., 2004). Fenolik bileşiklerin ayrıca anti-karsinojen, anti-atherojen, anti-ülser, anti-trombot, anti-inflamator, anti-mikrobiyel etkileri olduğu da belirtilmektedir (Halliwell, 2007). Bu

etkin özellikler fenolik bileşikleri dolayısıyla da bitkileri biyolojik açıdan önemli noktalara taşımaktadır.

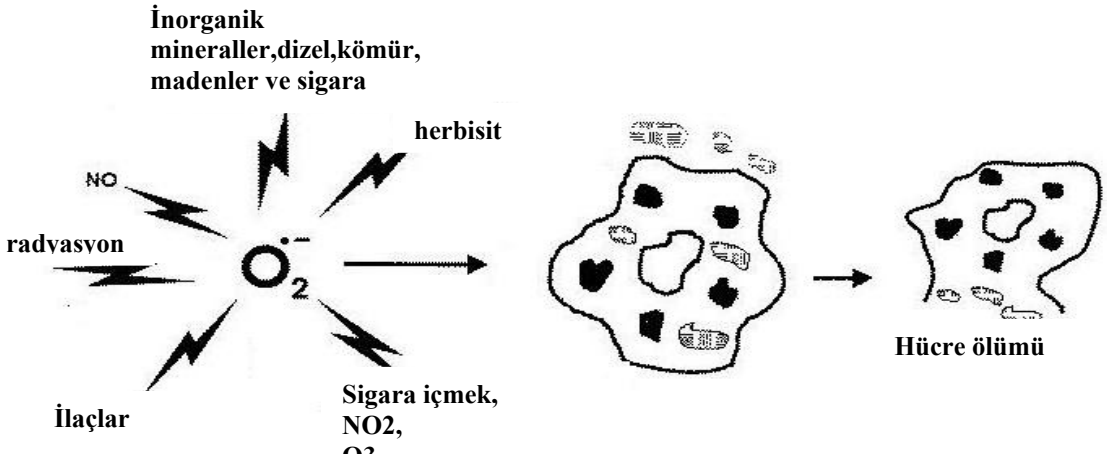
Acanthaceae familyası 250 cins ve 2700 türden oluşan büyük bir familyadır (Amer ve ark., 2004). Genellikle Güney Nijerya ve Güneydoğu Asya'da yayılmaktadır (Meyer and Lavergne, 2004). Birçok türü Afrika'da görülmektedir. Ancak birkaç çeşidinin Güney Avrupa ile Avustralyadan Malezya ve Güney Asya'ya kadar uzandığı görülmektedir (Kanchanapoom ve ark., 2006; Amin ve ark., 2012). Türkiye'de 8 türü bulunmaktadır (*A. dioscoridis var. Lacinitaus, A. dioscoridis var. perringii, A. dioscoridis var. dioscoridis, A. dioscoridis var. Brevicalilis, A. hirsutus, A. syriacus, A. spinosus, A.mollus*) ve 6 tanesi endemiktir, Ülkemizde özellikle Batı, Orta ve Güney Anadolu'da dağılış göstermektedir. (Demiriz, 1984). Acanthaceae familyası bitkileri ekonomik açıdan Akdeniz ülkeleri mimarisinde dekoratif bir motif olarak kullanılırken (Bhattacharyya ve Johri, 1998), çin ve Tayland da uzun yıllar yaygın bir geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır. (Phisalaphong ve ark., 2006; Kanchanapoom, ve ark., 2006). Acanthus türlerinin hepatosplenomegali, hepatit, lenfoma ve astım gibi bazı hastalıkların tedavisi için kullanıldığı rapor edilmiştir (Hokputsa, ve ark., 2004). Ayrıca bazı bölgelerde kabız giderici, balgam söktücü, yara iyi edici olarak kullanıldığı (Baytop,1999) ve mantar hastalığı tedavisi için yapılan ilaçlara katıldığı da belirtilmektedir (Savran ve Bağcı, 2002) . Halk arasında adı 'ayı pençesi' ya da 'Tüylü ayı pençesi' olarak ifade edilmektedir.

Bu tez çalışmasında *Acanthus hirsutus* bitkisinin hazırlanan aseton özütünün antioksidan aktiviteleri farklı test sistemleri uygulanarak tespit edilmiş olup, ortaya çıkarılan sonuçlar kapsamında bitkinin özellikle farmakolojik etkileri üzerine önemi vurgulanmak istenilerek çeşitli sektörlerde ham madde olarak kullanılıp kullanılamayacağının, kullanılması durumunda ise sağlayacağı katkıların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Serbest Radikaller

20. yüzyılın başlarında depolanan yağların bozulmalarına neden olan etkenler araştırılırken serbest radikal adı verilen bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir. Serbest radikaller; atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran , eşleşmemiş elektronları sebebiyle de genellikle kararsız ve çok reaktif moleküller olarak ifade edilmektedirler (Halliwell ve Gutterıdge, 1999; Mates ve ark., 1999) Serbest radikaller sahip oldukları eşleşmemiş elektronların belirtilmesi açısından üst kısımlarına bir nokta $(X^{\bullet})$ yazılarak gösterilmektedirler (Akkuş, 1995). En basit serbest radikal bir elektron ve bir protonu olan hidrojen atomudur. Serbest radikallerdeki eşleşmemiş elektronlar kararlı duruma geçebilmek için kararlı halde bulunan diğer bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Bu durum bir zincir reaksiyon halinde devam eder ve bir çok radikal oluşmasına neden olur (Gökpınar ve ark., 2006). Yaşam için çok gerekli olmalarına rağmen zincir halinde gelişen reaksiyonlarla artış gösteren bu serbest radikaller metabolizmada önemli etkilere neden olurlar. Hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi önemli bileşikleri ile oldukça kolay reaksiyona girerek hücreleri harabiyete uğratır hatta ölümüne neden olabilirler. Bunun sonucunda ise kanser, kalp-damar hastalıkları, eklemlerde kireçlenme, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, hipertansiyon, istemik hasar, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları gibi istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedirler (Halliwell ve ark., 1990; Arıduru ve Arabacı, 2013).



Şekil 2.1. Serbest radikallerin etkisi ve sebepleri (Pourmorad ve ark., 2006)

Serbest radikaller organizmada normal metabolik olaylar sonucu oluşabildiği gibi organizmanın çeşitli dış etkenlerle karşı karşıya gelmesi sonucunda da oluşmaktadır. Bu yüzden serbest radikalleri oluşturan nedenler endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. **Endojen nedenler** ; mitokondrial sızıntı , solunumsal patlama enzim reaksiyonları, Otooksidasyon reaksiyonları iken; **Eksojen nedenler**; sigara dumanı, alkol, UV ışınları, iyonize radyasyon, ksenobiyotikler, hava kirliliği, ilaçlar, stres, diet faktörleridir (Southorn ve Powis, 1988).

Serbest radikaller temelde üç yolla oluşmaktadır (Akkuş, 1995; Kayış, 2010):

a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağın ayrılması ile bağ yapısındaki iki elektronun her birinin ayrı ayrı atomlar üzerinde kalması.

X:Y→X · +Y·

b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybı olmasıyla dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalması sonucu radikal forma dönüşmesi.

A:→A · + e-

c) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi: Radikal özelliği bulunmayan bir moleküle bir elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşmasıyla radikal meydana gelmesi.

A + e-→ A ·

Serbest radikaller ; reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve reaktif sülfür türleri olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar.

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

- Süperoksit radikali
- Ozon
- Singlet oksijen

- Hidrojen peroksit
- Hidroksil radikali
- Hipoklorik asit
- Alkoksil radikali
- Peroksil radikali
- Hidroperoksil radikali

Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)

- Nitrik oksit
- Nitrik dioksit
- Peroksinitrit

Reaktif Sülfür Türleri (RST)

- Thiyl radikali

Çizelge 2.1‘ de bazı radikallerin tanımı yapılmıştır.

Çizelge 2.1. Bazı serbest radikaller ve özellikleri (Halliwell, 1994)

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	$H^{\bullet}$	En basit serbest radikal
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	$^{\bullet}OH$	En fazla reaktif oksijen radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Triklorometil	$CCl_3^{\bullet}$	C merkezli radikal, CCl_4 metabolizması sonucu üretilir ve genellikle O_2 ile hızla reaksiyona girer.
Tiyil	$RS^{\bullet}$	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	$RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	$NO_2^{\bullet}$	$NO^{\bullet}$'nun O_2 ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Singlet oksijen	$^1O_2$	Oksijenin güçlü oksidatif formu

Aerobik metabolizmalarda serbest radikaller başlıca oksijenden oluşmaktadır ve oksijenden oluşan serbest radikaller '**Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'** dir. ROT'lar biyolojik açıdan da en önemli serbest radikal sınıfıdır (Kayış, 2010).

Oksijen molekülü (O2) iki adet eşlenmemiş elektrona sahip olup kimyasal açıdan diradikaldir ve diradikal oksijen yüksek derecede ROT oluşturma eğilimindedir. O2 molekülündeki eşleşmemiş elektronlar farklı orbitallerde bulunmalarına rağmen hareket yönleri aynıdır. O2 molekülü bir elektron alıcısı olarak davranır ve hareket yönünün tam tersi yönünde elektronlar alarak oksidasyon yapar, böylece reaktif oksijen türlerini meydana getirir (Eroğlu, 2012; Sies, 1997).

Reaktif oksijen türleri**, radikal olanlar** (tek elektronunu bir başka moleküle verebilenler) ve **radikal olmayanlar** (elektron eksiği olmamasına rağmen başka bir molekül ile radikallere göre daha zayıf bir şekilde birleşebilenler) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar.

Çizelge 2.2.Reaktif oksijen türlerinin gruplandırılması

Radikal olanlar	Açıklama	**Radikal olmayanlar**	Açıklama
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikali	$HO^{\bullet}$	Lipid hidroperoksit	LOOH
Peroksil radikali	$ROO^{\bullet}$	Hipohaloz asit	HOX
Alkoksil radikal	$RO^{\bullet}$	N-halojenli aminler	R-NH-X
Semikinon radikal	HQ	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hemoproteine bağlı serbest radikaller		Ozon	O_3
		Azotdioksit	NO_2

Serbest radikallerin en önemlileri süperoksit radikali ($O_2\bullet$-), hidroksil radikali ($\bullet$OH), singlet oksijen ($^1O_2$) , hidrojen peroksit (H_2O_2), ve peroksinitrit (ONOO-) dir (Arıduru,2013).

2.1.1.Süperoksit radikali

Aerobik hücrelerde oksitleyici olan moleküler oksijenin bir elektron alması ile indirgenmesi sonucu oluşmaktadır (Fridovich, 1975).

$$\underset{\text{Doğal Oksijen}}{O^{\cdot}\text{-}O^{\cdot}} + 1e^{-} \longrightarrow \underset{\text{Süperoksid}}{O^{\cdot}\text{-}O}$$

Ayrıca dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi esnasında da süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilmektedir. Süperoksit radikalini önemli kılan işlevi hidrojen perokside kaynak oluşturması ve geçiş metallerini indirgeyebilmesidir. Dış etkenler ve metabolizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla en fazla oluşan reaktif oksijen radikali süperoksit radikalidir. Hasar yapıcı etkisi ise fazla değildir (Akkuş, 1995; Dikici, 1999; Eroğlu, 2012; Ünal, 1999; Kılınç ve Kılınç, 2002)

2.1.2. Hidrojen peroksit

Süperoksidin etrafında bulunan moleküllerden bir elektron alması ile oluştuğu gibi moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması ile oluşacak peroksitin iki proton ile birleşmesi sonucunda da meydana gelmektedir.

$$\text{Doğal oksijen} + 2e^{-} \text{ veya Süperoksid} + 1e^{-} \longrightarrow \underset{\text{Peroksid}}{O\text{-}O}$$

$$\text{Peroksid} + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 \text{ Hidrojen peroksid}$$

Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçebilmektedir ve uzun ömürlü bir oksidandır. Bir serbest radikal olmayan Hidrojen peroksit reaktif oksijen türleri içinde yer alır ve serbest radikal biyokimyasında oldukça önemli bir role sahiptir.Hidrojen peroksiti bu derece önemli yapan özelliği , süperoksit ile reaksiyona girerek fazlaca reaktif olan ve zararlı etkiler göstererek önemli hasarlara neden olan hidroksil radikalini oluşturmasıdır(Dikici, 1999; Eroğlu, 2012; Murray ve ark, 1996).

2.1.3. Hidroksil radikali

Geçiş metallerinin etkisi ile hidrojen peroksidin indirgenmesi sonucu meydana gelmektedir.

$O^{\cdot} + H^{+} \longrightarrow {}^{\cdot}OH$ hidroksil radikali

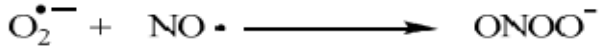
Hidroksil radikalinin yarılanma ömrü çok kısadır, bununla birlikte son derece reaktif bir radikaldir ve tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Reaktif oksijen türlerinin en güçlü etkiye sahip olanıdır. Dolayısı ile oluştuğu yerde büyük hasara neden olabilmektedir (Eroğlu, 2012; Akkuş, 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1990)

2.1.4. Singlet oksijen

Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin enerji alarak var olduğu orbitalden başka bir orbitale geçiş yapması veya kendi dönüş yönünün aksi yönünde yer değiştirmesi sonucu meydana gelmektedir. Yüksek reaktiviteye sahiptir. Singlet oksijen, doymamış yağ asitleri ile direkt olarak tepkimeye girmekte ve peroksi radikalinin (ROO.) oluşmasınada neden olmaktadır(Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999; Eroğlu, 2012; Kılınç ve Kılınç, 2002)

2.1.5. Nitrik oksit

L-arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle sentezlenmektedir ve fizyolojik süreçlerde önemli role sahiptir. Tek sayıda elektron içerir ve renksiz bir gaz formunda olup reaktivitesi düşük bir serbest radikaldir. Eşleşmemiş elektrona sahip olmasına rağmen birçok biyomolekülle kolayca reaksiyona giremeyen nitrik oksit diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girebilmektedir. Canlılarda aşırı nitrik oksit sentezlenmesi nöronlarda ciddi hasarlar meydana gelmesine neden olmaktadır. Nitrik oksititin bu zararlı etkisinin süperoksit radikali ile girdiği tepkime sonucu oluşan peroksinitrit (ONOO-) den kaynaklandığı düşünülmektedir. Peroksinitrit , nitrik oksitin fizyolojik etkisini inhibe etmekte ve oksidatif etkisini ortaya çıkarmaktadır (Eroğlu 2012; Kılınç ve Kılınç, 2002 ; Halliwell, 1994; Nathan, 1994)



Peroksinitrit

2.2. Antioksidanlar

Vücudumuzda ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte, bunun sonucunda ise hücreleri olumsuz etkileyebilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir. Ve bu durum 'Oksidatif Stres' olarak ifade edilmektedir (Stahl 2003, Zhao ve ark., 2006). Oksidasyon sonucu oluşan bu reaktif türler normal düzeyde olduğu sürece zararlı bir etki göstermemektedir. Ancak oluşturdukları zincir reaksiyonlar ile gösterdikleri artış hücrelerde ciddi hasarlara neden olabilmektedir. Bu açıdan önemli olan reaktif oksijen türlerinin belli bir düzeyin üstüne çıkmalarını önlemek ve karşı bir savunma mekanizması oluşturarak inhibe edilmelerini sağlamaktır. ROT oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalara "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" denilmektedir (Akkuş, 1995; Antolovich ve ark., 2002; Gönenç ve ark., 2002). Antioksidanların ilk teşhis edilen etkisi zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bu sebeple antioksidanların ilk tanımı lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak ifade edilmiştir. Bugün ise antioksidanların sadece lipidler üzerinde değil proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri de kapsayan bir koruyucu etkilerinin olduğu bilinmekte ve tanımda antioksidanlar, hedef moleküllerde oksidan hasarı engelleyen ve geciktiren maddeler olarak ifade edilmektedir. Bu tanımla bağlantılı olarak antioksidan etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (Burton, 1989).

Antioksidan savunma mekanizması dört şekilde işlemektedir (Gutteridge, 1995; Gökpınar ve ark., 2006) ;

- **Söndürme etkisi**, Radikal metabolit üretimini önlerler (Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.)
- **Süpürme etkisi**, Üretilmiş radikalleri temizlerler (Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.)

- **Onarma etkisi**, Oluşan hücre haraplanmasını onarırlar (Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.)
- **Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi,** (Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.)

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla dışarıdan da temin edilebilmektedir. Vücut hücreleri tarafından üretilen (endojen) antioksidanlar; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

Enzimatik endojen antioksidanlar;

- Hidroperoksidaz
- SOD
- GST
- CAT
- GSH-Px

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar;

- Melatonin
- Seruloplazmin
- Transferrin
- Miyoglobin
- Hemoglobin
- Ferritin
- Bilirubin
- Glutatyon
- Sistein
- Metiyonin
- Ürat
- Laktoferrin
- Albümin

Gıda yoluyla alınan antioksidanlar (eksojen) ise; sentetik antioksidanlar ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. (Hilmi, 1994; Antolovich ve ark., 2002; Gökpınar ve ark., 2006; Keser, 2012; Altan ve ark., 2006)

Sentetik antioksidanlar

- BHA
- BHT
- TBHQ
- Propil gallat
- Kuersetin

Doğal antioksidanlar

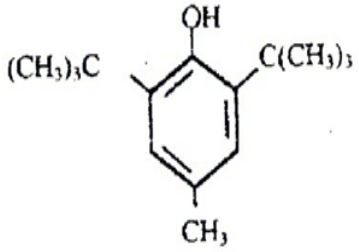
- Tokoferoller
- Karotenler
- Fenoller
- Flavonlar
- Katesinler

Çizelge 2.3. Bazı antioksidanlar ve etki ettikleri reaktif oksijen türleri (ROT) (Percival, 1998)

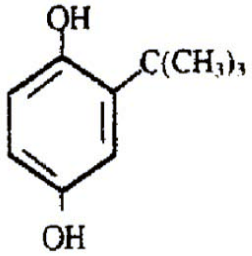
ROT	**ANTİOKSİDANLAR**
Hidroksil radikal	Vitamin C, Glutatyon, Flavonoid, Lipoik asit
Süperoksid radikal	Vitamin C, glutatyon, flavonoid, SOD
Hidrojen peroksid	Vitamin C, Glutatyon, beta karoten, Vitamin E, CoQ10, Flavonoid, Lipoik asit
Lipid peroksid	Beta karoten, Vitamin E, flavonioid, glutatyon peroksidaz

Serbest radikallere karşı gelişen savunma sisteminin sağlıklı işlemesi ve zararlı bileşiklerle antioksidanlar arasındaki dengenin korunması organizmanın canlılığını sürdürmesi açısından çok önemlidir. Endojen antioksidanların yetersiz kaldığı noktada dışarıdan gıda yoluyla alınan antioksidanların destekleyici etkilerine ihtiyaç vardır

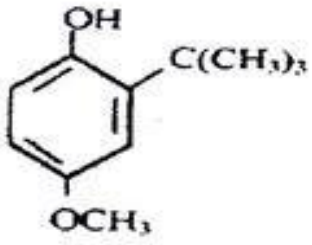
(Delican, 2002). Bu durum gıdaların işlenmesi sırasında sentetik antioksidanların kullanılmasına yol açmıştır. Sentetik antioksidanların en önemlileri BHT, BHA, PG ve TBHQ' dur. halkasal gösterimleri şekil 2.2'deki gibidir.



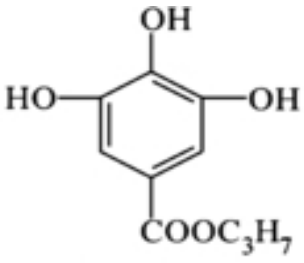
a) BHT



b) TBHQ



c) BHA



d) PG

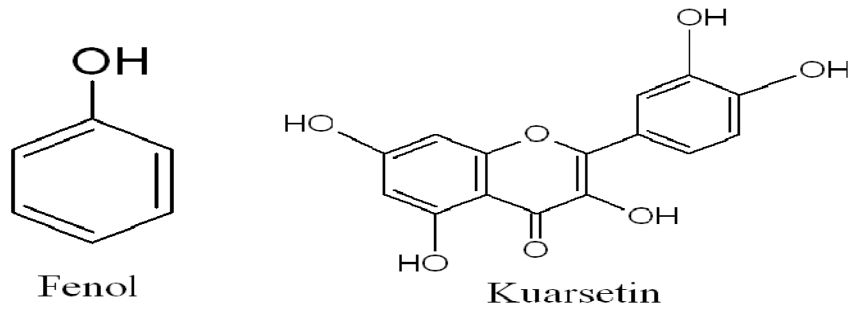
Şekil 2.2. Sentetik antioksidanlar (a.bütil hidroksi toluen b. propil galat,c.butil hidroksi anisol d.tersiyer bütil hidrokinon)

Ancak zamanla yapılan çalışmalarla elde edilen bulgularda sentetik antioksidanların sağlık açısından fazlaca toksik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Vareltzis ve ark., 1997; Koleva ve ark., 2002; Çapanlar, 2008) Bu durum doğal antioksidanlara büyük önem kazandırmıştır. Sentetik antioksidanların kanserojen etkilerine karşın doğal antioksidanların antikanserojen etkileri olduğu gibi, diğer pek çok sağlık verici etkilerinin bulunduğu da ifade edilmektedir. Bitkiler antioksidan içeriği oldukça yüksek olan iyi bir doğal antioksidan kaynağıdır (Rice-ivens ve ark., 1997; Ramamoorthy ve Bono, 2007; Khalaf ve ark., 2008, Namiki, 1990). Bu antioksidanlar β-karoten, fenolik bileşikler, C ve E vitaminleridir. Yapılan bir çok

araştırma meyve ve sebze tüketimi ile bazı kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu göstermektedir . (Tsao and Yang, 2003)

2.3. FENOLİK BİLEŞİKLER

Bitki dünyasının büyük bir kısmında bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan fenolik bileşikler bitkinin meyve, tohum, gövde, dal, yaprak ve çiçek gibi organlarında bulunurlar ve meyve ve sebzelere buruk tat ile kendilerine özgü rengi verirler. İnsan yaşamı için de oldukça gerekli sekonder metabolizma ürünlerinden olan fenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010; Arıduru ve Arabacı, 2013). Fenolik bileşikler bir ya da daha çok fenolik grubun aromatik halkaya direkt bağlanmasıyla oluşmaktadır. Şekil 2.3 'de kuarsetin fenolik bileşiğinin halkasal yapısı verilmiştir. Güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşiklerin aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Yapılarındaki aromatik halkaları ile hidroksil (OH) gruplarını yakalayarak peroksit radikallerini etkisizleştirirler. Ayrıca –OH grubunun pozisyonu da antioksidan aktivite açsından önemlidir. 4'-OH ve 3'-OH grupları içerenlerin antioksidan aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Lien ve ark., 1999; Halliwell, 2000).



Şekil 2.3.Fenol halkası ile bir fenolik bileşik örneği (kuarsetin)

Fenolik bileşikler, serbest radikal süpürücü, enzimatik aktiviteyi düzenleyici, hücre proliferasyonunu inhibe edici, anti-karsinojen, anti-atherojen, anti-ülser, anti-inflamator ve anti-mikrobiyal etki göstermektedir. İnsanlarda hastalıklara sebep olan serbest radikallere karşı koruyucu etki gösteren fenolik bileşikler aynı zamanda yaşlanmayıda geciktirmektedir (Bravo, 1998; Ksouri ve ark., 2007).

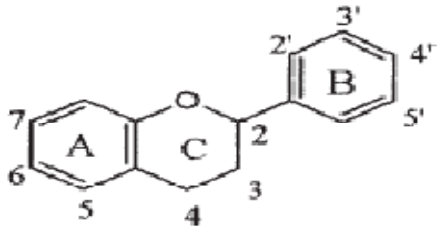
Fenolik bileşikler; fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Nizamlıoğlu, 2010).

2.3.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler; kimyasal olarak, benzoik ve sinamik asitlerin hidroksillenmiş türevleridirler. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 (fenilmetan) yapısındadır ve bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar, Hidroksisinamik asitler ise C6-C3 (fenilpropan) yapısındadır ve kendisine bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre değişiklik göstermektedir. En yaygın hidroksisinamik asit türevleri p-kumarik, kafeik, klorojenik ve ferulik asitler; hidroksisinamik asit türevleri ise, gallik, p-hidroksibenzoik, vanilik ve protokateşik asitlerdir. Gıdalarda bulunan fenolik asitler renk, aroma, koku, acılık, burukluk ve oksidatif stabilite üzerinde etkilidirler. (Tuncel ve Yılmaz, 2010; Balasundram ve ark., 2006)

2.3.2. Flavonoidler

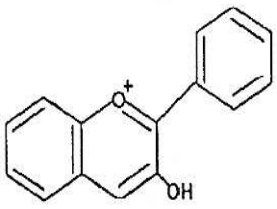
Bitki fenollerinin en geniş sınıfını flavonoidler oluşturmaktadır (Cadenas ve Packer, 2002). Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır. Flavonoidlerin genel yapısı şekil 2.4'deki gibidir.



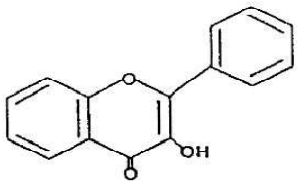
Şekil 2.4. Flavonoidlerin genel yapısı (Liu, 2004)

Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan fenolik bileşiklerdir (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010). Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan flavonoidlerin sentetik üretimi günümüzde gerçekleştirilmediğinden, elde edilmeleri için tek kaynak flavonoid içeren bitkilerdir (Jovanovic ve ark., 1994). Flavonoidler bitkilerdeki sarı, kırmızı ve mavi

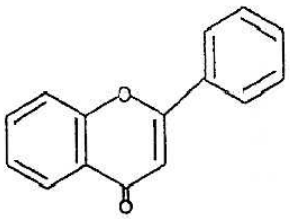
renk pigmentlerinin oluşmasını sağlamaktadır (Dikici, 1999). Bitkilerin özellikle kök, gövde, yaprak, kabuk ve çiçeklerinde yer almaktadırlar. Dogada 400'den fazla flavonoid tanımlanmaktadır ve flavonoidler halka yapılarına göre, Antoksantinler ve Antosiyaninler olarak gruplara ayrılmaktadır. Antosiyaninler, gıdalarda doğal olarak bulunan pigment maddeleridir. Antosiyaninlerin yapı taşları antosiyanidinlerdir (DAO ve ark., 1998).. Antoksantinlerin bitkilerdeki dağılımı, antosiyaninlere göre oldukça yüksektir. Antoksantinler kendi içlerinde flavanoller, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar olarak sınıflandırılmaktadır (Koca, 2005).Halkasal yapıları Şekil 2.5 'de verilmiştir.



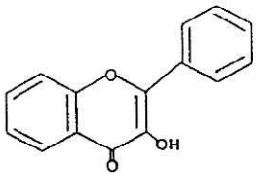
Antosiyanidin



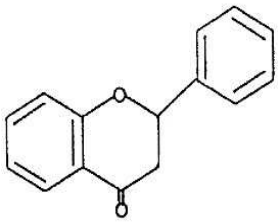
Flavon



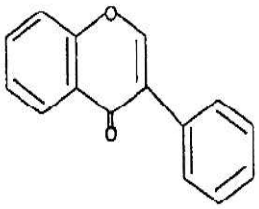
Flavanol



Flavonol



Flavanon



İzoflavon

Şekil 2.5. Antosiyanidin, Flavon, Flavanol, Flavonol, Flavanon, İzoflavon temel kimyasal yapıları

Flavonoidler antitoksidan ozelliklerini gosterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmaları;

1. Süperoksit radikali (O_2-') ve hidroksil radikalini ('OH) ve singlet oksijeni (O_2) temizler.

2. Peroksil radikalini (ROO) ve alkoksil radikalini (RO') yakalar, lipid peroksil (LOO') zincirini kirar.
3. Ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe eder
4. Demir ve bakir gibi gecis metallerini şelatlar.
5. Protein kinaz enzimini inhibe eder.
6. Laktat transportunu engeller (Bors ve ark., 1990; Morel ve ark., 1993; Formica ve Regelson, 1995).

Flavonoidlerin antioksidan özelliklerini belirlemede önemli olan üç yapısal özellik;

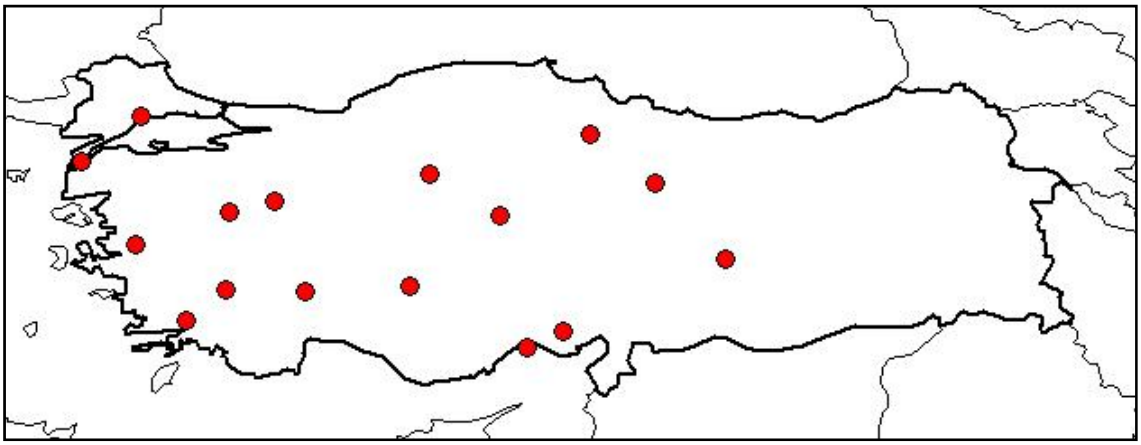
1. B halkasındaki 3´,4´-dihidroksil yapısı (kateşin, kuarsetin vb.).
2. C halkasındaki 4-okso grubuyla bitişik 2,3 çift bağları.
3. C halkasında bulunan 3-OH grubu ve A halkasında bulunan 5-OH grubudur (Michalak, 2006).

2.4. Acanthaceae familyası ve *Acanthus hirsutus*

Türkiye üç fitocoğrafik bölgenin buluştuğu noktada olması, ılıman iklim kuşağına sahip olması ve büyük yükseklik farklarından dolayı oldukça geniş bir floristik çeşitliliği sahiptir. (Ilçım, 1998). Türkiye florası bünyesinde yaklaşık 10.000 bitki türü bulunmaktadır ve bunun ortalama 1000 kadarı genel olarak kullanılmakla birlikte, sadece 400 tıbbi bitki türünün ticaretinin yapıldığı ve tıbbi fayda sağlandığı bilinmektedir. (Kan, 2010) Ülkemizde halen daha incelenmemiş bir çok bitki türünün olduğu tahmin edilmektedir.

Acanthaceae familyası 250 cins ve 2700 türden oluşan büyük bir familyadır (Amer ve ark., 2004). Çoğu çalı veya otsu bitkilerdir. Familya, genellikle Güney Nijerya ve Güneydoğu Asya'da yayılır. Bir çok türü Afrika'da görülür ancak birkaç çeşidi güney Avrupada ve Avustralyadan, Malezya ve Güney Asya'ya kadar uzanır. (Meyer ve Lavergne, 2004; Çapanlar, 2008). **Acanthus** cinsi 30 tür içermektedir (Anonim, 2013), Türkiye'de 8 türü bulunmaktadır, 6 tanesi endemiktir. Ülkemizde özellikle Batı, Orta ve Güney Anadolu'da dağılış göstermektedir. Türkiye'de bulunan *Acanthus türleri ; A. dioscoridis* var. *Lacinitaus, A. dioscoridis* var. *perringii, A.*

dioscoridis var. *dioscoridis, A. dioscoridis* var. *Brevicalilis, A. hirsutus, A. syriacus, A. spinosus, A.mollus'*dur (Demiriz, 1984).



Şekil 2.6. *Acanthus hirsutus*'un Türkiye'de yayılışı

Acanthus hirsutus türünün halk arasındaki adı 'Ayı pençesi ' olarak bilinmektedir. *Acanthus hirsutus* bitkisi çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları basit, opposit ve ekstipulatedir. Çiçekleri zigomorf (düzensiz, asimetrik) dir.. Kaliks, derinden 4 loblu ayrılır. Korolla 3 alt dudaktan oluşur, üst dudak yoktur. Kısa tüplüdür, stamen 4, anterler tek bölmelidir. Ovaryum süperior, 2-loküler, plasenta aksil , ovüllller genellikle üst üstedir. Meyve kapsüllüdür. Bitki boyu 10 ile 45 cm arasındadır, yoğun şekilde uzun tüylere sahiptir. Korolla soluk yeşilimsi-sarı renktedir (Davis, 1985).

Bazı **Acanthus** türlerinin antioksidan, antimikrobiyal, analjezik, antikanserojen, antitümör ve antifertility aktiviteleri olduğu belirtilmektedir (Bravo ve ark., 2004). Ayrıca Acanthus türlerinin hepatosplenomegali, hepatit, lenfoma ve astım gibi bazı hastalıkların tedavisi için kullanıldığı rapor edilmiştir (Hokputsa ve ark., 2004). Acanthus hirsutus'un ise bazı bölgelerde kabız giderici, balgam söktücü, yara iyi edici olarak kullanıldığı (Baytop, 1999) ve mantar hastalığı tedavisi için yapılan ilaçlara katıldığı belirtilmektedir (Savran ve Bağcı, 2002) .

Taksonomisi,

- Alem: ***Plantae***,
- Şube :***Magnoliophyta***
- Sınıf : ***Magnoliopsida***
- Altsınıf : ***Asteridae***
- Takım : ***Scrophulariales***
- Familya : ***Acanthaceae***
- Cins : ***Acanthus***
- Tür : ***Acanthus hirsutus*** BOISS.



Şekil 2.7. *Acanthus hirsutus* (Çapanlar, 2008)



Şekil 2.8. *Acanthus hirsutus* (Anonim, 2013)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Çalışmada kullanılan bitki örneği

Tez kapsamında kullanılan *A. hirsutus* Konya-Altınapa Barajı civarından (Konya-Beyşehir arası, Altınapa Baraj Yanı, Başarakavak yolu üzeri, 1272 m, 37° 53' 50" K, 32° 18' 28" D, orman açıklığı) çiçeklenme döneminde toplanmış olup Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Murad Aydın ŞANDA tarafından taksonomik olarak teşhis edilmiştir.

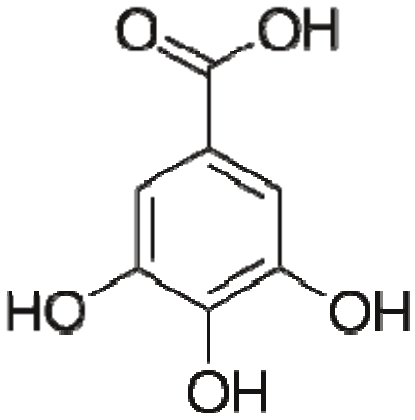
3.2. Bitkisel Ekstraktının Hazırlanması

Bitkisel örnekler toplanıp gölgede kurutulduktan sonra değirmende iyice toz haline getirildi. Toz haline gelen örneklerden yaklaşık 15 gr tartılıp soklet düzeneğinde altı saat süreyle aseton ekstraksiyonuna tabii tutuldu. Ekstraksiyon sonunda ekstraklar filtre kağıdından (Whatman mavi band) süzüldü. Daha sonra çözücü rotary evaporatorde 40°C'de tamamen buharlaştırıldı. Ele geçen ham ekstrakt antioksidan kapasite testleri uygulanıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesinde Uygulanan Metotlar

3.3.1. Toplam fenolik madde tayini (Folin yöntemi)

Bitki ekstraklarının konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 20 mg bitki tartılıp 10 ml metanolde çözüldü. Bitkisel droglardan 200 µl ayrı deney tüpülerine alındı. Daha sonra her bir tüpe 1.5 ml su ve 0.5 ml %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden eklendi. 3 dakika beklendikten sonra 0.1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 760 nm'de absorbansları ölçüldü. Tüm antioksidan kapasite tayin testlerinde spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de tekrarlandı. Bitkilerin fenolik madde içeriği gallik asit eş değeri olarak verildi (mg GAE/g) (Slinkard ve Rossi 1965).



Şekil 3.1. Gallik asit

3.3.2.Toplam Flavonoid Tayini

1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan bitki ekstrakları (1 ml) aynı miktarda %2'lik $AlCl_3$ ile karıştırıldı ve daha sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. Örneklerin absorbansları 415 nm'de okundu. Aynı işlemler standart olarak kullanılan rutin içinde yapıldı ve örneklerin flavonoid içerikleri rutine eşdeğer olarak hesaplandı (mg RE/g) (Arvouet-Grand ve ark., 1994).

3.3.3. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi

Metodun esası Mo(VI)'nın Mo(V)'e indirgenmesi ve asidik ortamda yeşil renkli fosfat/Mo(V) kompleksinin oluşumuna dayanır. Metotta öncelikle bitki ekstraklarının konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Standart olarak ise askorbik asit kullanıldı. Metotta kullanılacak reaktif çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlandı:

0.6 M H_2SO_4 çözeltisi: 0.83175 ml H_2SO_4 alınır ve 24.18825 ml saf su üzerine sızdırılarak ilave edildi

28 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$ çözeltisi: 0.025 gr $Na_2HPO_4.12H_2O$ tartılıp hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlandı.

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

Bu şekilde hazırlanan çözeltiler bir mezürde karıştırılarak reaktif çözeltisi hazırlanmış olur. 2 mg/ml konsantrasyonunda bitkisel çözeltilerden 0.3 ml bir tüpe

alınır ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden 3 ml eklendi. Tüpler kuvvetlice karıştırılıp 95°C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorbansı 695 nm'de okundu. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan askorbik asit için de yapıldı. Antioksidan aktivite askorbik asit eşdeğeri (mg AE/g) olarak hesaplandı (Prieto ve ark. 1999).

3.3.4. DPPH süpürme etkinliği

Bitkisel drogların ve sentetik antioksidanların farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki bu bitkisel çözeltilerden 1 ml alınıp bunun üzerine 1 ml konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden (final konsantrasyonu 0.2 mM) ilave edildi. Tüpler ağızları kapatılıp kuvvetlice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanslar 517 nm'de okundu. Bitkisel çözeltilerin ve standart maddelerin (BHA ve BHT) inhibisyonu aşağıdaki denklemden hesaplandı (Sarikurkcu ve ark. 2009). Kontrol çözeltisi olarak ekstrak yerine metanol eklendi.

$$\text{İnhibisyon}(\%)=((A_{\text{kontrol}}-A_{\text{örnek}})/\ A_{\text{kontrol}})x100$$

3.3.5. β-karoten/Linoleik asit test sistemi

Bitkisel materyal 1, 0.5 ve 0.25 mg/ml ve standart antioksidanlar ise 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Metotta öncelikle emülsiyon çözeltisi hazırlandı. Bunun için 1 mg β-karoten 2 ml kloroformda çözüldü. Bu karışıma 50 µl linoleik asit ve 200 mg Tween 40 eklendi. Karışım iyice karıştırıldı. Kloroform rotary evaporatörde 40°C'de iyice uçuruldu. Kalan kısım üzerine 200 ml saf su eklendi. Böylece emülsiyon çözeltisi hazırlanmış oldu.

Farklı konsantrasyonundaki bitkisel droglar ve standart maddelerden 350 µl alındı ve bunların üzerine 2.5 ml emülsiyon çözeltisinden ilave edildi. Emülsiyon çözeltisi eklenir eklenmez absorbansları 490 nm'de okundu. Daha sonra tüpler 2 saat inkübe edildi. Aynı işlemler standart olarak kullanılan BHA ve BHT içinde tekrarlandı (Dapkevicius et al., 1998; Sokmen ve ark., 2004).

120 dakika sonunda renk açılım oranı hesaplandı.

R=ln(A/B)/t A:Başlangıç absorbansı

B:120 dakika sonundaki absorbansı

t:120 dakika

Bu eşitlikten inhibisyon değeri yani antioksidan aktivite hesaplandı.

İnhibisyon değeri= $((R_{kontrol}-R_{örnek})/ R_{kontrol})x100$

3.3.6. Bakır indirgeme gücü (CUPRAC testi)

***10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi.*;** $CuCl_2.2H_2O$'den 0.4262 g tartılarak su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat tamponu; 1 M (pH=7). NH_4Ac'dan 19.27 g tartılarak su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neokuproin çözeltisi: $7.5x10^{-3}$ M, Neokuproin (2,9 dimethyl 1-10 phenantroline)'den 0.039 g tartılarak %96'lık etil alkolle 25 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Bitki ekstraklarının 0.25 mg/ml ile 1 mg/ml arasındaki farklı konsantrasyonları kullanıldı. Metotta öncelikle her bir deney tüpüne 1 ml $CuCl_2.2H_2O$, 1 ml amonyum asetat, 1 ml neokuproin çöeltileri ile 0.6 ml saf su eklenir. Daha sonra her bir tüpe bitkisel çözeltilerden 0.5 ml eklenip iyice karıştırıldı. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika beklendi. Aynı işlemler BHA ve BHT çözeltileri içinde yapıldı. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm'de okundu (Apak ve ark., 2006).

3.3.6. FRAP/TPTZ testi

Frap metodu bitkisel ekstraktının Fe(III)/TPTZ kompleksini Fe(II)/TPTZ kompleksine indirgemesi prensipine dayanır. Bitkisel özütlerden (0.25, 0.5 ve 1 mg/ml) 0,1 ml alınıp üzerine 2 ml FRAP reaktif karışımı eklendi. Reaktif karışımı 10:1:1 oranında asetat tamponu (0,3 M pH:3.6), 40 mM HCl içinde 10 mM TPTZ ve 20 mM $FeCl_3$ içerir. Bu şekilde hazırlanan tüpler 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve absorbansları 593 nm'de okundu. (Aktümsek ve ark., 2013).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan içerik

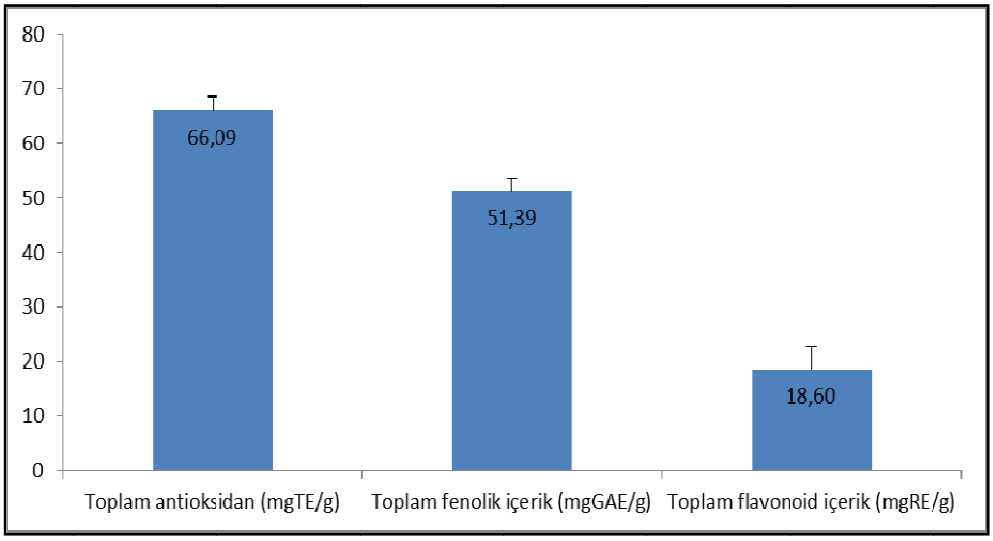
Bitkisel sekonder metabolitleri içerisinde fenolik bileşikler oldukça güçlü antioksidan özelliklere sahiptirler ve yapılan birçok çalışmada fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasında güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. Fenolik bileşikler içerisinde temel grubu flavonidler oluşturur. Flavonoidlerin antioksidan, antibakterial ve antimutagenik gibi çok sayıda etkileri rapor edilmiş ve halen birçok çalışmanın temel araştırma konusu durumundadır. Çalışılan aseton ekstraktın toplam fenolik içeriği gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı ve bu amaçla gallik asitin bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Toplam fenolik içerik 51.39 mgGAE/g olarak belirlenmiştir. Flavonoid içerik ise rutine eşdeğer verildi ve bu amaç için rutinin bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Flavonoid içerik 18.60 mgRE/g olarak tespit edilmiştir.

Fosfomolibdat testi son zamanlarda özelikle kolay olması ve kullanılan reaktiflerinin ucuzluğu nedeniyle oldukça sık uygulanmaktadır. Metodun temel özelliği asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo (VI)'yı Mo(V)'e indirgemesi ve sonuçta yeşil renkli fosfat/Mo (V) oluşmasına dayanmaktadır. Oluşan bu bileşik 695 nm'de absorbsiyon göstermektedir. Metodun sonuçları antioksidan özellikleri bilinen askorbik asit veya troloksa eşdeğer olarak verilmektedir. Bu amaçla troloksun farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. *A. hirsutus*'un aseton ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi 66.09 mgTE/g olarak belirlenmiştir. Kumaran ve Karunakaran (2008) *Phylanthus* türleri üzerine yaptıkları çalışmada toplam antioksidan kapasite 275 mgAE/g ile 376 mgAE/g arasında tespit edilmiştir. *A. hirsutus*'un *Phylanntus* türlerinden daha düşük toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. Toplam antioksidan, fenolik ve flavonoid içerikleri

Toplam antioksidan (mgTE/g özüt)	66.09±2.58*
Toplam fenolik içerik (mgGAE/g özüt)	51.39±2.00
Toplam flavonoid içerik (mgRE/g özüt)	18.60±4.10

*Aritmetik ortalama±S.S



Şekil 4.1. Toplam antioksidan, fenolik ve flavonoid sonuçları

4.2.DPPH serbest radikal süpürme etkinliği

Serbest bir radikal kullanılarak bitkisel drogların bunu belli oranda etkisiz hale getirmelerine dayanan test sistemleri antioksidan metotların en önemlilerindendir. Bu test sistemlerinin ortak özelliği çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan radikal çözeltilerine bitkisel ekstrakt ilave edilir ve meydana gelen renk değişimi spektrofotometrik olarak belirlenir. Bu amaçla en sık kullanılan radikallerden birisi DPPH'dır. Antioksidan bileşiklerle karşılaşınca DPPH'ın mor renginin şiddetinde azalma ve buna bağlı olarak absorbansda düşmeler olacaktır. $DPPH^{\cdot}$ ile antioksidan bileşik arasında gerçekleşen reaksiyon aşağıdaki gibidir:

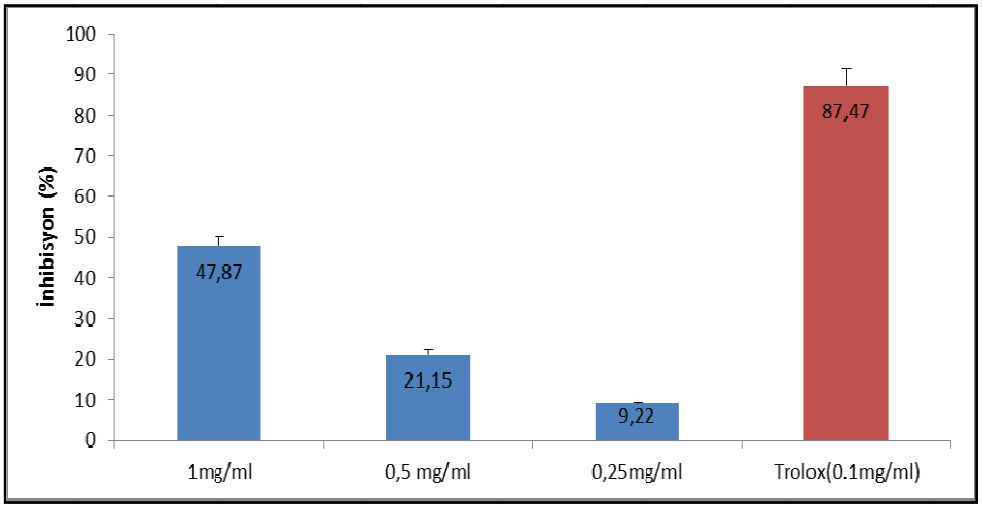
$$DPPH^{\cdot} + ArOH \rightarrow DPPH + ArO^{\cdot} + H^{-}$$

Farklı konsatrasyonlarda hazırlanan metanolik ekstraktın DPPH radikali üzerine etkisi Çizelge 4.2. gösterilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak bitkisel ekstraktın konsantrasyonu arttıkça radikal süpürme aktivitesi de artmıştır. Bitkisel ekstraktın en düşük konsantrasyonu olan 0.25 mg/ml'de radikal süpürme oranı %9.22 gibi oldukça düşük seviyededir. Ekstraktın 1 mg/ml'lik çözeltisinde ise etkinlik %47.87'ye kadar çıkmaktadır (Çizelge 4.2.). Ancak her ne kadar bu konsantrasyonda bitkisel özüt etkin olsa da standart antioksidan olan troloks çok düşük derişimlerde bile oldukça etkilidir. 0.1 mg/ml konsantrasyonda troloks %87.47 oranında inhibisyon yeteneğine sahiptir.

Çizelge 4.2. DPPH serbest radikal süpürme testi sonuçları

Konsantrasyonlar (mg/ml)	İnhibisyon (%)
1	47.87±2.25*
0.5	21.15±1.24
0.25	9.22±0.25
Troloks (0.1 mg/ml))	87.47±3.95

*Aritmetik ortalama±S.S



Şekil.4.2. DPPH serbest radikal süpürme testi sonuçları

4.3. β-karoten/linoleik asit test sistemi ile lipid oksidasyonunu engelleme yeteneği

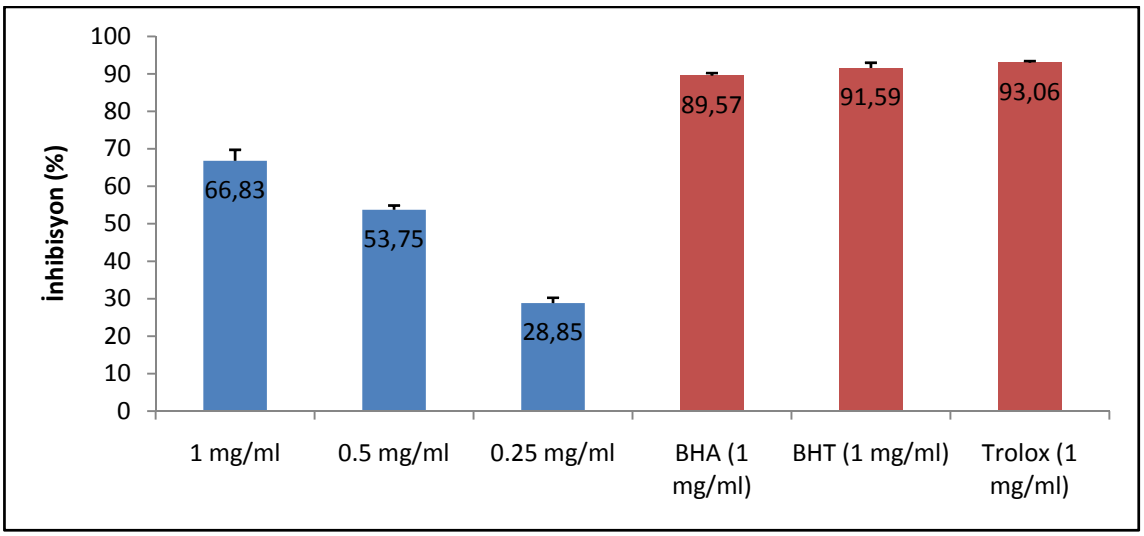
Bu yöntem, β- karotenin linoleik asit oksidayonu sonucu oluşan peroksit radikallerinin bu molekülde meydana getirdiği renk açılımını antioksidanların hangi oranda inhibe ettiğinin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır. *A. hirsutus*'un 1, 0.5 ve 0.25 miligramlık derişimlerinin β-Karoten-linoleik asit sistemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'de verilmiştir. Bu konsantrasyonlarda çalışılan aseton ekstrakt sırasıyla %66.83, %53.75 ve %28.85 oranında linoleik asit oksidasyonunu inhibe etmiştir. Standart antioksidanlar Troloks, BHA ve BHT ise 1 mg/ml konsantrasyonunda linoleik asit oksidasyonu inhibe etme yetenekleri oldukça fazladır.

Bununla birlikte sentetik antioksidanların sağlık üzerine olumsuz etkilerinden dolayı, *A. hirsutus*'un doğal antioksidanların kaynağı olarak gıda endüstrisinde yağ asidi oksidasyonunu engellemek için kullanılabilecek niteliktedir. Bu test sistemi kullanılarak çeşitli bitkilerin linoleik asit oksidasyonu inhibe etme oranları şu şekilde belirlenmiştir. Örneğin, *Glycyrrhiza echinata*'da %79.84 (Cakmak ve ark., 2012), *Hieracium cappadocicum*'da %55.1 (Tepe ve ark., 2006) ve *Achiella biebersteinii*'de %22.7 (Barış ve ark., 2006) olarak belirlenmiştir.

Çizelge.4.3. β-karoten/linoleik asit testi sonuçları

Konsantrasyonlar (mg/ml)	İnhibisyon (%)
1	66.83±2.93*
0.5	53.75±1.13
0.25	28.85±1.40
BHA (1 mg/ml)	89.57±0.66
BHT (1 mg/ml)	91.59±1.40
Trolox (1 mg/ml)	93.06±0.37

*Aritmetik ortalama±S.S



Şekil 4.3. β-karoten/linoleik asit testi sonuçlarının dağılımı

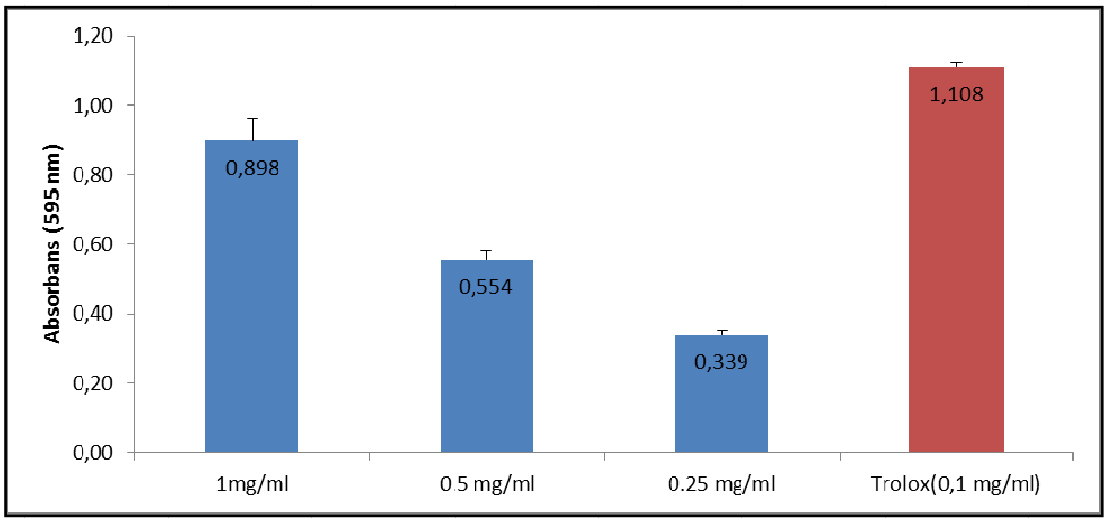
4.3. FRAP ve CUPRAC testi

Bitkilerin indirgeme gücü antioksidan potansiyellerinin değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Özellikle indirgeme gücü testleri antioksidan bileşiklerin elektron verme yeteneklerinin bir göstergesidir. Bu amaçla tez kapsamında *A. hirsutus*'un bakır ve demir indirgeme gücü araştırıldı. FRAP testi, bitkisel ekstraktın Fe^{+3}/TPTZ'yi Fe^{+2}/TPTZ'ye indirgenmesine ve bu durumun 595 nm spektrofotometrik olarak incelenmesine dayanır. Bu test sisteminde yüksek absorbans yüksek demir indirgeme potansiyelini göstermektedir. Testin sonuçlarında konsantrasyon arttıkça absorbans da artış göstermektedir. Absorbans değerleri ve konsantrasyon dikkate alındığında standart antioksidan olan troloks oldukça güçlü demir indirgeme potansiyeline sahiptir. Yapılan çok sayıda çalışmada bu metot ile diğer kapasite tayin testleri arasında güçlü korelasyon bulunmaktadır.

Çizelge 4.4. FRAP testi sonuçları

Konsantrasyon (mg/ml)	**Absorbans (595 nm)**
1	0.898±0.066*
0.5	0.554±0.027
0.25	0,339±0.013
Trolox(0.1 mg/ml)	1,108±0.014

*Aritmetik ortalama±S.S



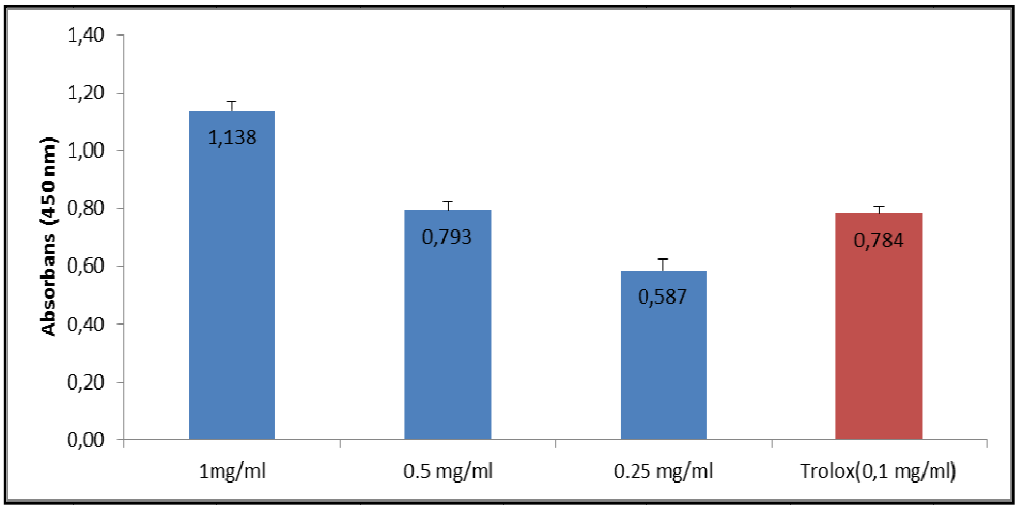
Şekil 4.4.FRAP testi sonuçlarının dağılımı

CUPRAC test sistemi bitkisel ekstrakların veya antioksidanların Cu(II)-neocuproine kompleksini Cu(I)-neocuproine indirgemesine oluşan renkli kompleksin absorbansının 450 nm'de ölçülmesine dayanır. Demir indirgeme gücünde olduğu gibi yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü göstermektedir. Yapılan çalışmalarda demir ve bakır indirgeme güçleri arasında güçlü bir korelasyon rapor edilmiştir. Yine çeşitli çalışmalarda CUPRAC test sistemi ile serbest radikal süpürme, toplam antioksidan kapasite ve β-karoten/linoleik asit gibi çeşitli antioksidan testleri arasında pozitif bir bağlantı rapor edilmiştir (Öztürk ve ark., 2007). Troloks ile *A. hirsutus*'un aseton ekstraktı kıyaslandığında troloksun oldukça güçlü etkinliğe sahip olduğu görülebilir (Çizelge 4.4 ve 4.5).

Çizelge 4.5.CUPRAC testi sonuçları

Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans (450 nm)
1	1.138±0.032*
0.5	0.793±0.030
0.25	0.587±0.037
Trolox(0,1 mg/ml)	0.784±0.024

*Aritmetik ortalama±S.S



Şekil 4.5.CUPRAC testi sonuçlarının dağılımı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada *Acanthus hirsutus*'un *invitro* antioksidan özellikleri: toplam antioksidan, serbest radikal yakalama, β-karoten/linoleik asit, bakır ve demir indirgeme güçlerini içeren beş farklı kimyasal test sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca toplam fenolik ve flavonoid içerik de belirlenmiştir. Test sistemlerinde *A. hirsutus*'un antioksidan olarak etkinliği kullanılan standart antioksidanlardan daha zayıf olarak tespit edilmiştir. Bu test sistemlerinin sonuçları ile toplam fenolik ve flavonoid içerik değerlendirildiğinde *A. hirsutus*'un orta düzeyde antioksidan etkinliğe sahip olduğu belirtilebilir.

5.2. Öneriler

Bu çalışma ile *A. hirsutus'*un antioksidan özellikleri ilk defa ortaya çıkarılmıştır. Bu çalıma ile bu türün daha fazla ilgi çekmesi sağlanacaktır. Günümüzde başta gıda ve farmakoloji alanında doğal antioksidanlar için yeni hammadde kaynaklarının tespiti büyük önem taşıdığı için *A. hirsutus'un* doğal antioksidanların bir kaynağı olarak kullanılabileceği belirtilebilir. Ayrıca bu tez çalışması tür üzerine yapılacak yeni çalışmalara temel oluşturacak ve ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

Amer M. E., Abou-Shoer M., Abdel-Kader M S., El-Shaibany A M.S., Abdel-Salam N.A, 2004, Alkaloids and flavone acyl glycosides from *Acanthus arboreus*, Print version ISSN 0103-5053, *J. Braz. Chem. Soc.* 15,2, 4-21

Amin E. , Radwan M. El-Hawary S., Fathy M., Mohammed R., Becnel J. and Khan I., 2012, Potent insecticidal secondary metabolites from the medicinal plant *Acanthus montanus*, *Rec. Nat. Prod*. 6,3, 301-305.

Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman,A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., Hayek, T., 2004, Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23, 423–433.

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

Arıduru R, Arabacı G, 2013, Ciğertaze otu (salvia officinalis) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, *SAÜ. Fen Bil. Der.* 17, 2, 241-246.

Antolovich, M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mcdonal S., Robards K., 2002, Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst,* 127, 183-198.

Altan, N., Dinçel, A.S. ve Koca, C., 2006, Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi, 31,* 51–56.

Anonim, 2008, Structure – Property / Activity Modeling of Polyphenols, http://www.mdpi.org/ijms/specialissues/spampolyphenols.htm,

Anonim, 2013, http://en.wikipedia.org/wiki/Acanthus_(plant)

Anonim, Tübives, http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=7384

Baytop T. 1999, Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi. İstanbul: *Nobel Tıp Kitabevi Yayınları*.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, Samir., 2006, Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.

Barış, Ö, Güllüce, M, Şahin, F, Özer, H, Kılıç, H, Özkan, H, Sökmen, M, Özbek T., 2006, Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae), Turkish Journal of Biology 30, 65-73.

Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M.,1999, Flavonoidler. *Aktif Yayınevi*, İstanbul, 334-354.

Bravo L.. 1998, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56, 317-333.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M., 1990, Flavonoid as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies Methods in Enzimology, 186,343-355,

Bhattacharya, B. ve Johri B.M., 1998, Flowering Plants: Taxonomy and Phylogeny. Berlin.

Burton G.W, 1989, Antioxidant action of carotenoids., *The Journal of Nutrition* 119, 1, 109-111.

Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook of Antioxidants, Marcel Dekker, *New York-Basel*.

Cakmak Y.S, Aktumsek, A, Duran A., 2012, Studies on antioxidant activity, volatile compound and fatty acid composition of different parts of *Glycyrrhiza echinata* L, EXCLI Journal 11, 178-187.

Ceylan A., 1995, Tıbbi Bitkiler I. E.Ü. *Ziraat Fakültesi Yayınları* III. Basım, Bornova/ İzmir, No:312.

Çapanlar S., 2008, Phytochemical and Biolocıcal Activity Studies on *Acanthus hirsutus* and *Cephalaria paphlagonica* Species, Master of Scıence Thesıs, Chemistry Department, Department Code: 4050201, Bornova, Ege üniversitesi

Davis, P.H. 1985, Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, Edinburgh Univ. Press, No:9, 253s.

Davis, P.H., Tan, K., Mill, R.,: 1988, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 10(Supplement), *Edinburgh Univ. Press,* Edinburgh.

Dao, L.T., Takeoka, G.R., Edwars, R.H. and Berrios J. DE J. 1998. Improved Method For The Stabilization Of Anthocyanidins. *J Agr Food Chem*. 46(9): 3564-3569.

Delican Y,D., 2002,Vitiligoda antioksidanlar ve nitrik oksid, İzmir , *Uzmanlık tezi*, 1-55

Demiriz Y, 1984, Acanthus: Türkiye'nin arkeoloji ve sanat tarihi terminolojisine yanlış adla girmiş bir bitki motifi, *Arkeoloji-Sanat Tarihi Dergisi,* Ege üniversitesi, 3:19-24.

Dığrak, M., İlçim, A., Alma, M.H. 1999, Antimicrobial activities of several parts of Pinus brutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, *Cedrus libani and Pinus nigra. Phytotherapy Research*, 13: 584-587.

Dikici I., 1999, Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, *Uzmanlık Tezi*, Konya, 73s.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2000, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Ankara (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler*), Red Data Book Of Turkish Plants* (Pteridophyta And Spermatophyta), Ankara, 246s,

Eroğlu Y., 2012, Judocularda ve sedanterlerde submaksimal egzersizin oksidan ve antioksidan sistem mekanizmalarına etkisi, yüksel lisans tezi, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık bölümleri enstitüsü, Beden eğitimi ve spor anabilim dalı, s5-21

Faydaoğlu E., 2011, Sürücüoğlu M.S, Geçmisten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi , Kastamonu univ., *Journal of Forestry Faculty*, 11 (1): 52 – 67.

Formica JV., Regelson W., 1995, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem.Toxic. 33* (12):1061-1080.

Fridovich, I., 1975, Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 44, 147-159.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C. 2000. Flora of Turkey, Volume 11, Edinburgh, Edinburgh University Press.

Gutteridge J.M., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem.; 41(12): 1819-1828.

Gökpınar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz Y., 2006, Algal Antioksidanlar, E.U. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences,* Cilt/Volume 23, Ek/Suppl. (1/1): 85-89.

Gönenç, A., Atak, Y., Orman, M. N., Şimşek, B., 2002, Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients, *Dialysis and Transplantation*, 31, 88-96.

Halliwell B., Gutterıdge JMC., 1990 , "Role Of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: AnOverview." In: Methods in Enzymology,186, 1-85.

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

Halliwell B., Gutterıdge JMC., 1999, *Free radicals in Biology and medicine (3rd ed.)*, Oxford University Press.

Halliwell B., 2000, Antioxidant activity and other biological effects of flavonoids. Wake up to flavonoids, *The Royal Society of Medicine Press Limited*, 13-23.

Halliwell B., 2007, Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your health Cardiovascular *, Research*, 73: 341-347.

Hilmi Ş., 1994, Oksidanlar ve antioksidanlar. THTDrg, 48:1-2,44-49.

Hokputsa, S., Harding S. E., Inngjerdingen K., Jumel, K., Michaelsen T.E., Heinze, T., Koschella, A., Paulsen B.S., 2004, Bioactive Polysaccharides from the Stems of the Thai Medicinal Plant *Acanthus ebracteatus*: Their Chemical and Physical Features, *Carbohydr. Res.*, 339, 753-762.

Ilçım A., Dığrak M., Bağcı E., 1998, Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması, *Tr. J. of Biology*, 22:119-125

Jovanovic S. V., S. Stenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. G. Simic, 1994, *Journal. American Chemical Society*, 116, 4846–4851.

Kaya A, 2010, Tıbbi Bitkiler ve Etnobotanik Çalışmalar, *Bitkilerle tedavi sempozyumu*, Zeytinburnu

Kalaycıoğlu A., Öner C., 1994. Bazı bitki ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin Amest-Salmonella test sistemi ile araştırılması. *Tr. Botany*, 18: 117-122.

Kan Y., 2010, Türkiye'de Tıbbi Bitkilerin Üretilmesi Ve Pazarlanması, *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, Zeytinburnu

Kayış, T., 2010, Diazinon'un subletal konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae L.*'nın eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri. Doktora tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı.

Kanchanapoom, T., Noiarsa, P., Otsuka, H. and Ruchirawat, S., 2006, Chemical Constituents of Acanthus volubilis Wall, Biochem. Syst. Ecol., 34(5), 442-445.

Khalaf N.A., Shakya A.K., Al-othman A., El-agbar Z., Farah H., 2008, Antioxidant Activity of Some Common Plants, Turk J Biol 32 , 51-55,

Keser S., 2012, Civanperçemi (Achillea millefolium),Alıç (Crataegus monogyna) ve Böğürtlen (Rubus discolor)'un Toplam Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Oksidatif Stres Oluşturulmuş Ratlarda Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi,Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, s5-24.

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

Koleva, I. I. ,van Beek, T. A., Linssen, J. P. H. , Groot, A. and Evstatieva, L. N., 2002, Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods, *Phytochem. Analysis*, 13:8-17.

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

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C.,Salinity, 2007, effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakile maritima. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 244–249.

Kumaran A, Karunakaran RJ., 2007, In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India, LWT-Food Science and Technology 40, 344-352.

Liu, R.H., 2004, Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 134: 3479S–3485S.

Lien EJ, Ren SJ, Bui HUH, Wang RB., 1999, Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 26, 285–94.

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C. ve Núnez de Castro, I., 1999, Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595–603.

Meyer, J.Y. and Lavergne, C., 2004, Beautés Fatales Acanthaceae Species as Invasive Alien Plants on Tropical Indo-Pacific Islands Diversity and Distributions, *Diversity Distrib*., 10, 333–347.

Michalak, A., 2006, Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 15, No. 4, 523–530.

Murray R,K., Granner D,K., Mayes P,A, Rodwell V,W., 1996, Harper"ın Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.) *Barış Kitabevi*, istanbul.

Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent 0, Pasdeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J., 1993, Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin, and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol. 45(1):13* 19.

Namıkı, M., 1990, Antioxidants/antimutagens in food. Crit. Rev. *Food Science and Nutrition* 29, 273-300.

Nizamlıoğlu N.M., Nas S., 2010, Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri, *Journal of Food Technologies* Vol: 5, No: 1, 20-35.

Nathan C, Xie QW. 1994, Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls, and Controls ,Cell, Vol. 78, 915-918, September 23.

Ozturk M, Aydogmus-Ozturk F., Duru M.E., Topcu G., 2007, Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant. 103, 623-630

.

Percival M, 1998, Antioxidants, *Nut. 031 1/96 Rev*. 10/98, Clınıcal Nutrıtıon Insıghts, Copyright Advanced Nutrition Publications, Inc., Revised

Phisalaphong, M., Thu Ha, N. T**.,** 2006, Desalting of Aqueous Extract of *Acantus ebracteatus* Vahl. By Nanofiltration, *Separ. Sci. Tech.,* 41, 455-470.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N., 2006, Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1142-1145.

Ramamoorthy P.K., Bono A., 2007, Antıoxıdants actıvıty, Total Phenolıc and Flavovoıd content of Morında Cıtrıfolıa Fruıt Extracts From Varıous Extractıon Processes , Journal of Engineering Science and Technology Vol. 2, No. 1, 70 – 80

Rıce-evans, C.A., Mıller N.J., Paganga G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.

Sarışen Ö., Çalışkan D. 2005, Fitothrapy: Herbal Medicine, *Attetion of in Primary Health Care,* cilt 14 ,sayı 8 ,182

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

Savran A., Bağcı Y., 2002, Kargıoğlu M, Gemerek (Sivas) VE Çevresindeki Bazı bitkilerin Yerel adları ve Etnobotanik , *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*,8(1)

Sıes H., 1997, *Physıologıcal Socıety Symposıum* ,Impaıred Endothelıal and Smooth Muscle Cell Functıon and Antıoxıdants,Experitnental Physiologv , 82, 291 -295

Stahl W., Sies H., 2003, Antioxidant activity of carotenoids, Molecular Aspects of Medicine, 24 :345–351,

Southorn P.A., Powis G., 1988, Free radicals in medicine. II.Involvement in human disease. Mayo *Clin Proc*, 63:390-408.

Tanker N., Koyuncu M., Coşkun M., 2007, Farmasötik Botanik, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, No:93,

Tsao, R., Yang, R., 2003, Optimization of a new mobile to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a tool phenolic index using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* A., 1018, 29-40.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat A.H., Yumrutas O., Sokmen A., 2006, Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of Pelargonium endlicherianum Fenzl., Verbascum wiedemannianum Fisch.&Mey., Sideritis libanotica Labill. subsp. linearis (Bentham) Borm., Centaurea mucronifera DC. and Hieracium cappadocicum Freyn from Turkish flora, Food Chemistry 98, 9-13.

Tuncel N.B., Yılmaz N., 2010, Kaz Dağları'ndan Toplanan Bazı Bitkilerin Fenolik Asit Kompozisyonlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi, *Akademik Gıda 8* , 3:18-23

Ünal D., 1999, Serbest radikaller. *Sendrom*, Mart, 68-80.

Vareltzis K., Koufidis D., Gavriilidou E., Papavergou E., Vasiliadou S., 1997, Effectiveness of natural rosemary (Rosmarinus offi cinalis) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Z Lebensm Unters Fors ch A*, 205: 93-96.

Yanbeyi S., 1999, Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole"ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, 88s.

Zhao G.R., Xiang Z.J., Ye T.X., Yuang Y.J., Guo Z.X., 2006, Antioxidant activities of salvia miltiorrhiza and panax notogingseng , *Food Chemistry* ,99,767-771,

Wei Y.H., Pang C.Y., 2005, The Role of Mitocondria in human aging process. *Biotech International*, 17: 8-13.

World Health Organization (WHO),. 1998, Guidelines for the Appropriate Use of Herbal Medicines. WHO, Manila. *WHO Regional Publications*, Western Pacific Series no. 23.

WHO: 1979 “Traditional Medicine”, World Health Organization, Geneva

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sevilay GÜNER
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Keçiören
Telefon : 05064999427
Faks :
e-mail : sewilay_guner@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	TINAZTEPE LİSESİ	2005
Üniversite	:	SELÇUK ÜNİVERSİTESİ	2012
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER