



T.C.  
AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Leucojum aestivum EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN,  
ANTİMİKROBİYAL VE PLAZMİT DNA ÜZERİNE AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilber ÖZGÜN HÜNDÜR

HAZİRAN 2019

Leucojum aestivum EKSTRAKTLARININ ANTIÖKSİDAN,  
ANTİMİKROBİYAL VE PLAZMİT DNA ÜZERİNE AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ

Dilber ÖZGÜN HÜNDÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman  
Prof. Dr. Vahit KONAR

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2019

*Leucojum aestivum* EKSTRAKTLARININ ANTIÖKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE  
PLAZMİT DNA ÜZERİNE AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Dilber ÖZGÜN HÜNDÜR

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, *Leucojum aestivum* ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal, plazmit DNA üzerine aktivitelerinin değerlendirilmesi ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile *Leucojum aestivum* ekstraktlarının toplam fenolik bileşiklerinin belirlenmesidir. *Leucojum aestivum*, göl soğanı olarak bilinir. *Leucojum aestivum* Türkiye'de tıbbi, aromatik ve süs bitkileri grubunda kategorize edilir. Bu çalışmada, bitkinin toprakaltı ve topraküstü kısımları ayrılarak tıbbi bitki olma potansiyeli tespit edilmek üzere etanol, metanol, hekzan çözücülerini ile ekstraktları hazırlandı. Ekstraktların antioksidan etkileri 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), demir indirgeme, metal şelatlama, total flavonoid, total fenolik yöntemleri ile tayin edildi. Elde edilen sonuçlar, kontrol olarak kullanılan butillenmiş hidroksianisol (BHA), gallik asit, kersetin, resorsinol ve askorbik asidin antioksidan etkileri ile karşılaştırılmıştır. Ekstraktların total fenol miktarları belirlenerek, değişik dalga boylarında HPLC analizi ile pik alanları tespit edilmiştir. HPLC ile hazırlanan ekstraktlardaki kateşin, kersetin flavonoidleri ve gallik asit fenolik bileşeni miktarı belirlenmiştir. Ekstraktlar kızılötesi spektroskopisi FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ile analiz edilmiştir. Fonksiyonel grupları belirlemek için TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) kullanılmıştır. Sonuç olarak, *Leucojum aestivum*'un etanol ve metanol ekstraktları yüksek fenolik ve flavonoid içererek yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Ayrıca *Leucojum aestivum*'un etanol ve metanol ekstraktlarının Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilere ve maya mantarlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve antimikrobiyal aktivite sonuçlarının DNA etkileşimi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Topraküstü ve toprakaltı ekstraktlarının FT-IR analizi sonuçlarına göre alifatik ve aromatik bölgelerde pikler görülmüştür. Toprakaltı ekstraktlarında NH grubuna rastlanmamıştır. TLC sonuçlarına göre topraküstü ekstraktlarında florosan özellik gösteren bileşenlerin olduğu görüldü. Ayrıca flavonoid özellik gösteren maddelerin varlığı bulunmuştur.

Sayfa Adedi : 103  
Anahtar Kelimele : *Leucojum aestivum*, antioksidant, DPPH aktivitesi, toplam flavonoid, antimikrobiyal, DNA etkileşimi  
Danışman : Prof. Dr. Vahit KONAR

DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF *Leucojum aestivum* EXTRACTS ON  
ANTIOXIDANT, ANTIMIKROBIAL AND PLASMID DNA

(M.Sc. Thesis)

Dilber ÖZGÜN HÜNDÜR

AMASYA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

June 2019

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the activity of *Leucojum aestivum* extracts antioxidant, antimicrobial, plasmid DNA and to determine the total phenolic compounds of *Leucojum aestivum* extracts by reverse phase high performance liquid chromatography. *Leucojum aestivum* is known as summer snowflake. *Leucojum aestivum* is categorized in the group of medicinal, aromatic and ornamental plants in Turkey. In this study, extracts with ethanol, methanol and hexane solvents were prepared to determine the potential of the plant to be separated by above ground and above ground parts of the plant. The antioxidant effects of the extracts were determined by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), iron reduction, metal chelating, total flavonoid and total phenolic methods. Infrared spectroscopy of the extract was analyzed by FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). TLC (Thin Layer Chromatography) was used to determine functional groups. The results obtained were compared with the antioxidant effects of butylated hydroxyanisole (BHA), Gallic acid, kersetin, resorcinol and ascorbic acid. Total phenol content of the extracts were determined and peak areas were determined by HPLC analysis at different wavelengths. The amount of kersetin, kersetin flavonoids and Gallic acid phenolic component in extracts prepared by HPLC were determined. As a result, the ethanol and methanol extracts of *Leucojum aestivum* show high antioxidant activity, including high phenolic and flavonoid. In addition, the ethanol and methanol extracts of *Leucojum aestivum* showed antimicrobial activity against Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeast and the results of antimicrobial activity were related to DNA interaction. According to the results of FT-IR analysis of the aboveground and subsoil extracts, peaks were observed in aliphatic and aromatic regions. No NH group was found in subsoil extracts. According to the results of TLC, the components which have fluorescent properties were found in the aboveground extracts. In addition, the presence of flavonoid properties were found.

PageNumber : 103  
KeyWords : *Leucojum aestivum*, antioxidant, DPPH activity, total flavonoid, antimicrobial, DNA interaction.  
Supervisor : Prof. Dr. Vahit KONAR

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Vahit KONAR'a; tezimin laboratuvar aşamasının her basamağında bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Dr. Öğretim Üyesi Önder İDİL'e; çalışmamın antioksidan aktivite belirleme, HPLC analizleri kısmında ve her basamağında bilgisini ve emeğini esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Melek GÜL'e; tez materyalimin toplanmasında emeği geçen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Nezahat KANDEMİR ve Prof. Dr. Şevket KANDEMİR'e; çalışmamın materyal ve metot bölümünün oluşturulmasında emeğini esirgemeyen Araş. Gör. Umut ÇELİKOĞLU'na ve Araş. Gör. Emine ÇELİKOĞLU'na; yüksek lisans eğitimim süresince ve öncesinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyerek her zaman bana destek olan, belki de en önemlisi yaşama dair birçok tecrübeler edindiğim sonsuz hoşgörülerini esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Emire ELMAS'a; tezimin bütün aşamalarında her türlü yardımlarını ve desteklerini hissettiğim arkadaşlarım; İkbâl MACİT, Burak ÖZÇELİK, Gülşah GÜNDOĞDU, Hamdi ÖZKUL, Ali TOKATLI, İbrahim TÜRKEK ve diğer tüm arkadaşlarıma; bu yoğun süreçte sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim hayat arkadaşım Ercan HÜNDÜR ve biricik oğlum Mehmet Akif HÜNDÜR'e; hayatım ve tüm eğitim yaşantım süresince, başarımla beraber her türlü zor zamanlarıma da ortak olan sevgili aileme ve özellikle de canım abim Dinçer ÖZGÜN'e; benden her konuda desteklerini ve güvenlerini esirgemedikleri için sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım. En derin saygı, hürmet ve sevgilerimle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Leucojum aestivum</i> L. (Göl soğanı) .....	4
2.1.1. Türkiye'nin geofit bitkileri.....	5
2.1.2. Amaryllidaceae (Nergisgiller) familyasının genel özellikleri.....	6
2.1.3. <i>Leucojum aestivum</i> 'un genel özellikleri.....	7
2.1.4. <i>Leucojum aestivum</i> türünün kullanım alanları .....	8
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	10
2.2.1. Malondialdehit (MDA) .....	12
2.2.2. Nitrik oksit (NO).....	13
2.2.3. Süperoksit radikali (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	13
2.2.4. Hidroksil radikali (OH <sup>•</sup> ) .....	15
2.2.5. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	15
2.2.6. Singlet oksijen ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ).....	16

2.2.7. Ozon .....	16
2.2.8. Egzersiz ve serbest radikaller .....	16
2.3. Serbest Radikallerin Oluşturduğu Oksidatif Hasar .....	17
2.3.1. Proteinler üzerine etkisi .....	17
2.3.2. Karbonhidratlar üzerine etkisi .....	17
2.3.3. Lipitler üzerine etkisi (lipid peroksidasyonu) .....	18
2.3.4. Nükleik asitler ve DNA üzerine etkisi .....	20
2.4. Antioksidanlar .....	20
2.5. Yapılarına Göre Antioksidanlar .....	23
2.5.1. Enzimatik antioksidanlar .....	23
2.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar .....	25
2.6. Antioksidan Aktivitenin Saptanmasına Yönelik Metodlar .....	31
2.6.1. TRAP metodu .....	31
2.6.2. ORAC metodu .....	32
2.6.3. ABTS/TEAC metodu .....	32
2.6.4. DPPH metodu .....	33
2.6.5. FRAP metodu .....	33
2.6.6. DMPD metodu .....	33
2.7. Ekstraksiyon .....	33
2.8. Sokslet Ekstraksiyonu .....	34
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>36</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	36
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	36
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları .....	42
3.3.1. Antioksidan yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	42

3.3.2. Antimikrobiyal yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	43
3.3.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılacak çözeltiler ve hazırlanması .....	43
3.4. Bitki Materyallerinin Toplanması, Kurutulması ve Ekstraksiyona Hazır Hale Getirilmesi.....	44
3.5. Bitkide Ekstraksiyon İşlemi .....	44
3.5.1. Hekzan ile ekstraksiyon .....	44
3.5.2. Etanol ile ekstraksiyon .....	45
3.5.3. Metanol ile ekstraksiyon .....	45
3.6. Ekstraktın Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması.....	45
3.6.1. DPPH radikali yakalama aktivitesi .....	46
3.6.2. Demir indirgeme aktivitesi.....	46
3.6.3. Metal şelatlama aktivitesi.....	47
3.6.4. Total flavonoid aktivitesi .....	47
3.6.5. Total fenolik aktivitesi .....	47
3.7. Ekstraktın Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması.....	48
3.8. Ekstraktın Plazmid DNA Üzerine Etkisinin İncelenmesi .....	48
3.9. TLC (İnce tabaka kromatografisi) Uygulama.....	48
3.10. HPLC Analizleri.....	49
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>52</b>
4.1. <i>Leucojum aestivum</i> Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerine Ait Bulgular.....	52
4.1.1. <i>Leucojum aestivum</i> ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi .....	52
4.1.2. <i>Leucojum aestivum</i> ekstraktlarının toplam fenolik ve flavanoid bileşiklerinin belirlenmesi .....	54
4.2. <i>Leucojum aestivum</i> Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerine Ait Bulgular..	55
4.3. <i>Leucojum aestivum</i> Ekstraktlarının Plazmid DNA Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesine Ait Bulgular .....	56



4.4. <i>Leucojum aestivum</i> Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemine Ait Bulgular.....	58
4.4.1. FT-IR (infrared) spektrum metodu.....	58
4.4.2. TLC (Thin Layer Chromatografi) uygulama .....	60
4.5. HPLC Analizi.....	61
4.5.1. <i>Leucojum aestivum</i> örneklerinin kromatogramları .....	64
4.5.2. <i>Leucojum aestivum</i> örneklerine ait bulgular .....	65
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	87

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Çeşitli <i>Leucojum aestivum</i> ekstraktların toplam fenolik ve flavanoid içerikleri.....	55
Çizelge 4.2. Çeşitli mikroorganizmalara karşı ekstraktların minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) .....	56
Çizelge 4.3. Gallik asit, kateşin ve kersetin miktarı için <i>L. aestivum</i> ekstraktların HPLC sonuçları .....	63



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Standart flavonoid türevlerini kullanarak HPLC .....	49
Şekil 3.2. Kateşin dalga boyu .....	50
Şekil 3.3. Gallik asit dalga boyu .....	51
Şekil 3.4. Kersetin dalga boyu .....	51
Şekil 4.1. <i>L. aestivum</i> ekstraktlarının ve standartlarının antioksidan aktivitesi Yoluyla tayini (a) İndirgeyici aktivite .....	53
Şekil 4.2. <i>L. aestivum</i> ekstraktlarının ve standartlarının antioksidan aktivitesi yoluyla tayini (b) Metal şelatlama aktivitesi .....	53
Şekil 4.3. <i>L. aestivum</i> ekstraktlarının ve standartlarının antioksidan aktivitesi yoluyla tayini (c) DPPH radikal sönümlenme aktivitesi .....	53
Şekil 4.4. pBR322 plasmid DNA 'nın etkileşimine dayalı agaroz jel elektroforezi sonuçları .....	58
Şekil 4.5. <i>Leucojum aestivum</i> topraküstü metanol ekstraktına ait spektrum .....	58
Şekil 4.6. <i>Leucojum aestivum</i> toprakaltı metanol ekstraktına ait spektrum.....	59
Şekil 4.7. <i>Leucojum aestivum</i> toprakaltı metanol ekstraktına ait spektrum.....	59
Şekil 4.8. Gallik asit (GA), kateşin (CA) ve kersetin(QU)'nin kromatogram Görüntüsü .....	61
Şekil 4.9. Gallik asit'in kalibrasyon eğrisi.....	61
Şekil 4.10. Kersetin'in kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.11. Kateşin' in kalibrasyon eğrisi .....	63
Şekil 4.12. <i>Leucojum aestivum</i> toprakaltı metanol ekstraktı kromatogram görüntüsü...	64
Şekil 4.13. <i>Leucojum aestivum</i> topraküstü etanol ekstraktı kromatogram görüntüsü ....	64
Şekil 4.14. <i>Leucojum aestivum</i> topraküstü metanol ekstraktı kromatogram görüntüsü .	65
Şekil 4.15. <i>Leucojum aestivum</i> toprakaltı etanol ekstraktı kromatogram görüntüsü.....	65

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. <i>Leucojum aestivum</i> 'un genel görünümü.....	5
Resim 2.2. <i>Leucojum aestivum</i> L.'un Türkiye'deki dağılımı .....	6
Resim 2.3. <i>Leucojum aestivum</i> 'un çiçekleri .....	9
Resim 2.4. Sokslet düzeneği .....	34
Resim 3.1. Bu çalışmada bitki örneklerinin öğütülmesi için Frisch pulverisette 16 .....	36
Resim 3.2. Fonksiyonel grupları görüntülemek için Perkin Elmer Frontier-FT-IR Spektrofotometresi (Infrared Spektrum) .....	37
Resim 3.3. Camag UV kabin .....	37
Resim 3.4. Antimikrobiyal aktivite analizlerinde sterilizasyon için Nüve Steam Art (OT-106) otoklav .....	37
Resim 3.5. Bakterileri büyütmek için WiseBath (Feedback Control Digital Timer Function) su banyosu .....	38
Resim 3.6. İnkübasyon için Nüve ES 500 ve FN 500 etüv.....	38
Resim 3.7. Standart grafiklerin oluşturulmasında ve örnek çözeltilerin absorbansların ölçülmesinde Genesys 10S UV-VIS spektrofotmetre.....	38
Resim 3.8. İlgili çalışmalar esnasında tüm tartımlar Precia 205 A hassas terazi.....	39
Resim 3.9. Tüm pH ölçümleri HQ40d multi pH-metre .....	39
Resim 3.10. Karıştırma işlemleri Stuart Orbital Shaker SSL1 .....	39
Resim 3.11. IKA RH basic 2 ısıtıcılı manyetik karıştırıcı .....	40
Resim 3.12. Saf su Sanyo Gallerkamp PLC saf su cihazı .....	40
Resim 3.13. Estrelerin DNA analizleri için; Arçelik MD 574 Mikrodalga .....	40
Resim 3.14. OWVTMD2 model yatay elektroforez.....	41
Resim 3.15. PeQPOWER 300V elektroforez güç kaynağı.....	41
Resim 3.16. Benchtop 2UVTM Transilluminator LM-20 görüntüleme cihazı .....	41

Resim 3.17. Antioksidan aktivite analizi için Sigma çok amaçlı soğutmalı santrifüj ve Eppendorf 5452 Minispin Centrifuge .....	42
Resim 3.18. Bitki ekstraktlarını hazırlamak için Heating Mantle MS-E mantolu ısıtıcı, Rotary Evaporatör ve Cooling System Status soğutma sistemi.....	42
Resim 4.1. Plazmit DNA formları .....	56



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NO<sub>2</sub></b>	Azot di oksit
<b>NO<sup>•</sup></b>	Nitrik oksit radikali
<b>µg</b>	Mikro gram
<b>µl</b>	Mikro litre
<b>mg</b>	Mili gram
<b>ml</b>	Mili litre
<b>mM</b>	Mili molar
<b>M</b>	Molar
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Singlet oksijen
<b>O<sub>2</sub></b>	Moleküler oksijen gazı
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup></b>	Süperoksit radikali
<b>HO<sup>•</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>HO<sub>2</sub><sup>-•</sup></b>	Hidroperoksit radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>LOO<sup>•</sup></b>	Lipit peroksit
<b>BHA</b>	Bütillenmiş hidroksianisol
<b>BHT</b>	Bütillenmiş Hidroksitoluen
<b>°C</b>	Selsius
<b>pH</b>	Asitlik derecesi

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RNS</b>	Reaktif nitrojen türleri
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>RO<sup>·</sup></b>	Alkoksi radikali
<b>ROO<sup>·</sup></b>	Peroksit radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroksinitrit
<b>GPx</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GSH</b>	Redükte glutasyon
<b>GST</b>	Glutasyon S-transferaz
<b>UV-VIS</b>	Ultraviyole-Görünür Bölge
<b>ppm</b>	Milyonda bir kısım
<b>FRAP</b>	Fe-III iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
<b>DPPH<sup>·</sup></b>	Serbest radikal sönmleme aktivitesi
<b>GA</b>	Gallik asit
<b>GAE</b>	Gallik asit eşdeğeri
<b>TCA</b>	Trikloroasetikasit
<b>ROOH</b>	Peroksil
<b>LOOH</b>	Lipit hidroperoksid
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozon
<b>HNO<sub>2</sub></b>	Nitröz asit

## 1. GİRİŞ

Doğal antioksidan kaynakları olarak bilinen bitki ve baharatların kullanımları ile ilgili çalışmaların her geçen gün arttığı bilinmektedir. Bitki uçucu yağ ve bileşenlerinin farmakolojik özellikleri incelenerek bunların tıp, kozmetik ve endüstriyel alanlarda kullanılabilmesiyle yararlı olabileceği belirtilmektedir. Sentetik antioksidan ve koruyucuların zararlı etkilerinden kaçınmak için bunların yerine kullanılacak özellikle bitkisel materyallerden oluşan doğal antioksidan ve antimikrobiyal maddelerin elde edilmesi üzerinde yoğun bir ilgi oluşmuş ve araştırmalar hızlanmıştır. Bu konuda yapılan araştırmalar sonucunda bitkisel materyallerin güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve çok sayıda fitokimyasal bileşik içerdiği görülmüştür. Günümüzde binlercesi tanımlanan ve bitkilerde ikincil metabolit olarak adlandırılan kimyasalların en yaygını fenolik bileşikler olup, fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturmaktadırlar (Harşit, 2015; Demir, 2011). Yapıları çok çeşitli olan fenolik bileşikler sekonder metabolitlerin en önemli ana gruplarından birini içermektedirler. Fenolik bileşikler bitki kaynaklı gıda ve içeceklerin, özellikle tat ve renk gibi özelliklerinden sorumlu olmasının yanı sıra meyve ve sebzelerin besin özelliklerine de katkıda bulunurlar. İnsan sağlığı açısından önemi ve gıda organoleptik (duyu organlarını etkileme yeteneği) özelliklerinden dolayı yapı ve biyolojik aktivitelerinin, terapötik maddelerin (terapide kullanılan maddeler) ve aynı zamanda gıda kalitesini kontrol etmek için potansiyellerinin araştırılması açısından oldukça önemlidirler (Tapas, Sakarlar ve Kakde, 2008).

Meyve, sebze ve bitkilerin yenen ve yenmeyen tüm bölümlerinde bulunan fenolik bileşikler (polifenoller), sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı biyoaktif bileşikler olarak adlandırılmaktadırlar. Fenolik bileşikler, bitkilerde yangı ve yaralanmaya karşı savunmada, UV ışınlarından koruma gibi fonksiyonlarının yanında, normal büyüme ve gelişme için de oldukça gerekli olan önemli bileşiklerdir.

Besinlerdeki zararlı maddeler, gün boyu soluduğumuz kirli hava, ozon tabakasının incilmesiyle oluşan güneş ışınlarının zararlı etkileri, bozulmuş yiyecekler, bilinçsiz beslenme, katkı maddeleri, herbisit ve pestisitler, ilaçlar, petrokimya ürünleri ve hareketsizlik vücutta serbest radikallerin oluşumuna sebep olup doku tahribine yol



açmaktadırlar. Serbest radikaller özellikle hücre ve bağışıklık sistemine saldırarak etkili olmaktadır. Tüm bunlara karşılık vücuttaki serbest radikallerin etkisini minimuma indiren, bloke eden, pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olan zincir reaksiyonlarını önlemekte görev alan maddeler bulunmakta ve bunlara “antioksidan” maddeler denilmektedir. Serbest radikallerin hücrel kaynakları ve serbest radikallere karşı hücrel antioksidan savunma mekanizmalarının aydınlatılması günümüzde bilinmeyen birçok klinik durumun ortaya çıkarılmasına neden olacağı düşünülmektedir (Harşit, 2015; Demir, 2011). Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden elektron çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşturmaktadırlar. Kararsız yapıda olduklarından organizmadaki diğer kararlı moleküllerin yapılarını bozarak bu kararlı moleküllerin kararsız hale geçmesine neden olurlar. Antioksidanlar ise bu kararsız serbest radikallere uygun elektronlar sağlayarak kararlı hale geçmesini sağlarlar. Serbest radikaller insan ve hayvanlarda fizyolojik aktiviteye bağlı olarak oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de meydana gelebilmektedirler (Aydemir, 2009; Nakaç, 2010). Serbest radikaller, genelde iç ve dış etkenlere bağlı olarak üretimlerindeki artış ve antioksidan sistemin yetersizliği sonucu başta membran lipidleri olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar ve DNA’ya önemli zararlar verebilmektedirler (Koca ve Karadeniz, 2003). Bu zararlar, hücrenin tipine, maruz kalınan strese ve şiddetine bağlı olarak (Freeman ve Crapo, 1982; Vaca, Wilhelm ve Harms-Ringdahl, 1988) toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilmektedirler (Nordberg ve Arner, 2001). Gelecekte hastalıkların tedavisinde antioksidanlar ile tedavinin önemli yer tutacağına inanılmaktadır ve bunun başarılı olabilmesi için reaktif oksijen moleküllerinin her bir hastalıktaki kesin rolünün en iyi şekilde belirlenmiş olması gerekmektedir (Pehlivan ve Uzun, 2015).

Organizmada oksidatif stres oluşturan değişik oksidantlara karşı antioksidan savunma sistemi vardır. Bu antioksidan savunma sistemi; serbest radikallerin aşırı üretilmesini engelleyerek, oluşan serbest radikallerin etkisini azaltarak veya oluşan oksidatif hasarı azaltarak ya da onararak etkisini göstermektedirler. Bu sistemler, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi endojen antioksidan enzimleri, glutatyon redüktaz (GSH)’ı, seruloplazmin ve transferrin gibi metal bağlayıcı proteinleri, Zn ve Cu gibi antioksidan özellikteki bazı elementleri ve A, C, E gibi antioksidan vitaminleri içermektedirler (Arıdurdu ve Abacı, 2013).

Bitkilerde farklı antioksidan bileşiklerin meydana geldiği bilinmektedir. Doğal antioksidanlar bitkilerin yaprak, gövde ve tohumları başta olmak üzere bütün organlarında bulunmaktadır. Doğal antioksidanların başlıcaları karetenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyonin ve endojen metabolitlerdir. Yapılan araştırmalarda bol miktarda sebze ve meyve tüketimi sonucu, hastalıklara yakalanma riskinin azaldığı, kalp damar hastalıklarında, kanser vakalarında ve ölüm oranlarında kayda değer azalmalar olduğu bildirilmiştir (Arıdur ve Abacı, 2013). Bitkiler alemindeki en önemli doğal pigmentlerden biri olan karotenoidler, doğal olarak oluşan tetrapirrol türevleri olan bileşiklerdir.

Bitki kökenli bileşiklerin biyolojik aktiviteleri yüzyıllardır bilinmesine rağmen 50 yıl öncesine kadar flavonoidlerin çalışma mekanizmasıyla ilgili bilginin çok az olduğu bilinmektedir. 1930 yılında Szent-Gyorggyi portakaldan yeni bir madde izole ederek bunu 'P vitamini' olarak adlandırmıştır. Ancak daha sonra bu maddenin aslında bir flavonoid olduğu ortaya çıkmıştır. Flavonoidlerin emilimi ve boşaltımı ile ilgili daha fazla veri toplamak için analitik teknikleri geliştirmeye ihtiyaç olduğu görülmüştür. Özellikle de kronik flavonoid alımının uzun dönem sonuçları hakkındaki veriler azdır. Doğal, sentetik ve hemisentetik flavonoidlerin, tek başına ve diğer önleyici ya da terapötik stratejilerle birlikte kanser, diyabet ve kardiyovasküler komplikasyonlar gibi en yaygın dejeneratif hastalıklara karşı etkili ilaçlar olacağı düşünülmektedir (Tapas ve diğerleri, 2008). Bitki türevli antioksidanlar singlet ve triplet oksijen kuşağı, serbest radikal giderici, peroksit parçalayıcı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak görülürler (Arıdur ve Abacı, 2013).

Amaryllidaceae familyasına ait olan *Leucojum aestivum* L. (*L.aestivum*) türü, sahip olduğu galantamin gibi değerli alkaloidleri nedeniyle tıp alanında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmanın amacı; halk arasında göl soğanı olarak bilinen Amaryllidaceae familyasına ait *L. aestivum* türünün toprakaltı ve topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, plazmid DNA'ya etkilerinin araştırılması ve HPLC ile kimyasal kompozisyonlarının belirlenmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Leucojum aestivum* L. (Göl Soğanı)

*Leucojum aestivum* L.'un sistematik sınıflandırılması:

Filum: Tracheophyta

Bölüm: Spermatophyta

Altbölüm : Angiospermae

Sınıf : Monocotyledoneae

Üst takım : Liliales

Takım : Liliales

Familya : Amaryllidaceae

Cins : *Leucojum* Linnaeus

Tür (Species): *Leucojum aestivum* L.

Alt tür : *L. aestivum* L. subsp. *pulchellum* ( Ekici, 2006)

Amaryllidaceae familyasının dünyada 60 cinsi ve 800 türü tanımlanmıştır (Watson ve Dallwitz, 2005). *Leucojum* cinsinin dünyada 10 türü bulunmaktadır (Şekil 2.1). Amaryllidaceae familyasına ait olan *L.aestivum* 30-60 cm boyunda soğanlı bir bitkidir. Mart ve Haziran aylarında çiçek açar. Çiçekleri çan şeklinde ve genellikle 1-5 tanedir. Çiçekleri 1 ay boyunca açık kalır. *Leucojum* cinsine ait 10 tür tanımlanmıştır. Bitki genellikle orman altlarında, tarla kenarlarında, 0-1100 m arasında nemli çayırlıklarda ve bataklık alanlarda yayılış göstermektedir.

*L. aestivum* ülkemizde İstanbul, Kocaeli, Beyşehir, Bursa, Bolu, Konya, Erzurum ve Samsun olmak üzere 8 ilde yayılış gösterir (Davis ve diğerleri, 1984). Türün Türkiye'deki asıl yaşam alanlarını, Karadeniz ve Marmara bölgesi taban arazilerindeki dişbudak (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) orman ekosistemleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte popülasyonları bu alanlarda da sınırlıdır ve söz konusu olan bu orman alanlarından odun dışı orman ürünü olarak toplatılmaktadır (Çiçek, Çetin, Özbayram ve Türkyılmaz, 2013). En bol bulunduğu yerler Samsun ve Beyşehirdir. Dünyada yayıldığı yerler ise İrlanda, İngiltere, Hollanda, Çekoslovakya, Kafkasya, Kuzey ve Kuzeybatı İran'dır.

*Leucojum* ismi Yunanca'da beyaz menekşe anlamına gelmektedir. Türkiye'de halk arasında ise göl soğanı, akçabardak, çan çiçeği, kabalak, sümbül, sarıklı kökü gibi isimlerle adlandırılmaktadır. *L. aestivum* kışın son zamanlarında veya baharın erken dönemlerinde nergislerle birlikte görülmesinden dolayı birçok ülkede yaz kardeleni olarak isimlendirilmektedir (Ekici, 2006). *L. aestivum* türünün sahip olduğu galantamin gibi değerli alkaloidleri nedeniyle biyokimyasal ve medikal araştırmalarda yoğun olarak kullanılan, bu özellikleri nedeniyle tıp alanında önemli bir yere sahip olan türdür. Galantamin alkaloidi, çocuk felci sonucu meydana gelen hasarların ve Alzheimer hastalığının tedavisinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Heinrich ve Teoh, 2004). Galantaminin *L. aestivum* türündeki varlığı araştırılmış ve bu maddenin ara metabolitlerinin özellikle ovaryum duvarı, çiçek sapı ve tepalde yoğun olarak bulunduğu ve pek çok hastalığın tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır (Ekici, 2006).

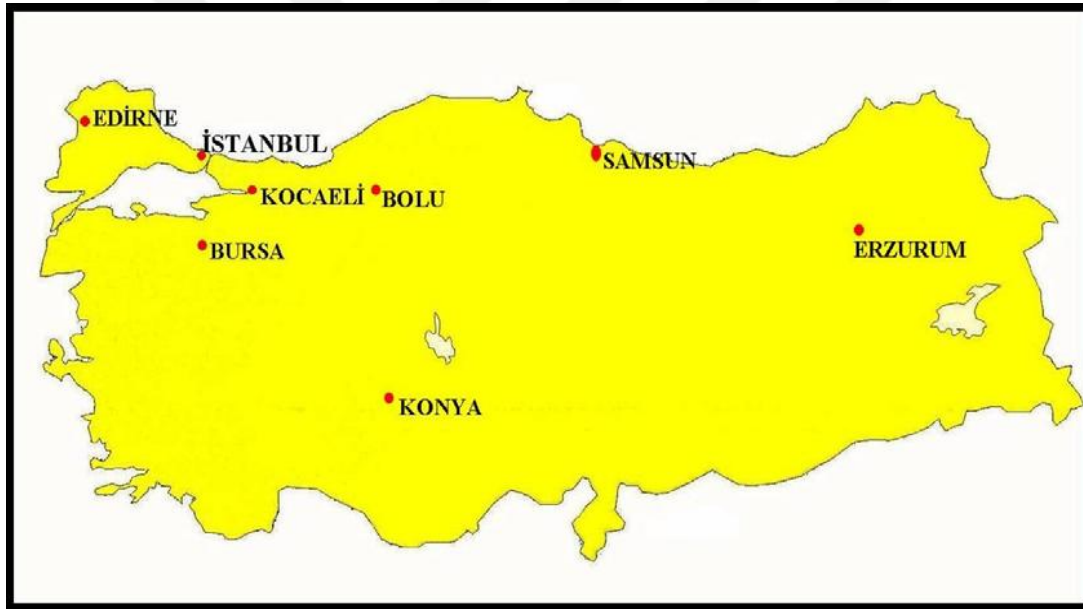


Resim 2.1. *Leucojum aestivum*'un genel görünümü

### 2.1.1. Türkiye'nin geofit bitkileri

Bilindiği gibi ülkemiz oldukça zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Ülkemizde yayılış gösteren yaklaşık 11 000 bitki türünden yaklaşık 3 500 kadarının endemik olduğu bilinmektedir. Geofitler toprakaltında soğan, rizom, yumru gibi özelleşmiş toprakaltı gövdelere sahip olan bitkilerdir. Ülkemiz geofit bitkiler açısından zengin bir ülke konumundadır. Türkiye de yaklaşık olarak 900 geofit bitki taksonu yayılış göstermektedir.

Liliaceae, Araceae, Primulaceae, Iridaceae, Geraniaceae, Orchidaceae, Ranunculaceae ve Amaryllidaceae familyaları geofit bitkiler açısından zengin olan familyalardır. (Koyuncu ve Alp, 2014). Geofitler yaklaşık bir asırdan beri yurt dışına ihraç edilmektedir ve geofitler içerisinde soğanlı-çiçekli bitkiler önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle 1960'lı yıllardan itibaren bu ticaret oldukça yüksek miktarlara ulaşmıştır ve bu ticaretin sonucunda birçok tür büyük tahrip görmüştür (Çiçek ve diğerleri, 2013). *L. aestivum* türü dünyada doğal olarak Kuzey Afrika, Avrupa ve Güneybatı Asya ile Akdeniz kıyılarında yayılış göstermektedir. Avrupa'da İrlanda, İngiltere, Hollanda, İspanya, İsviçre, İtalya, Belçika, Almanya, Fransa, Avusturya, Yugoslavya, Macaristan, Arnavutluk, Romanya, Bulgaristan, Ukrayna ve Türkiye; Asya'da ise İran, Rusya ve Ermenistan'da yetiştirilmektedir (Ekici, 2006).



Resim 2.2. *Leucojum aestivum* L.'un Türkiye'deki dağılımı (Ekici, 2006).

### 2.1.2. Amaryllidaceae (Nergisgiller) familyasının genel özellikleri

Amaryllidaceae familyası tropikal bölgelerde özellikle Güney Amerika ve Afrika ile Akdeniz kıyılarında yayılış göstermektedir. Amaryllidaceae familyası daha çok soğanlı veya rizomlu bitkilerden oluşmakla birlikte ayrıca soğan ile rizom arasında geçiş formlarına sahip çok yıllık; yapraksız gövdeli; yaprakları yassı veya şeritsi, bazen etli veya sert ve lifli olup, kış mevsiminde genellikle dökülmektedir; çiçekler tek veya infloresans durumda ve infloresans da kimoza, umbella veya başcık şeklinde; brakteller tek tek olduğu

gibi involokrum şeklinde 2, 8 veya daha fazla sayıda, serbest ve bitişik durumlarda; tepaller 3+3 olarak iki sıralı dizilmiş, 6 parçalı petaloid tipte beyaz, yeşil, krem, kırmızı, sarı, pembe, mor veya kahverengi; andrekeum 3, 6, 9 veya 18 stamenli ve genellikle 3+3 dizilişli; staminod yok; anterler genellikle versatil, nadiren bazifiks bazı türlerde ise dorsifiks tipte; anterler, por ile ya da yarılarak açılır; nektaryumlar tepallerde ve ginekeumda septumlarda; ovaryum alt durumlu, sinkarp, 3 karpelli, 3 gözlüdür ve ovul çok sayıda; meyve lokulusit kapsül veya bakkadır (Ekici, 2006).

Amaryllidaceae familyasının bazı türlerindedeki kimyasal yapıya ve farmakolojik etkilere sahip alkoloitlere rastlanmıştır. Bu familya ülkemizde 6 doğal, 2'si kültür 8 cins ve 33 tür ile temsil edilmektedir (Davis, 1988; Arslan ve diğerleri, 2004). Bu familyanın pek çok türü süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Tanker, 1998). Ayrıca familyanın bitkileri güzel kokulardan dolayı esans endüstrisinde çok önemlidir (Amina, 2008).

2008) *Leucojum* cinsinin sadece iki türü vardır: *L. vernum* ve *L. aestivum*. *L. aestivum*, Kuzey Afrika, Avrupa, Güneydoğu'da doğal olarak yayılış göstermektedir. Amaryllidaceae ailesi üyelerinin erkek ve dişi gametofitleri yeraltında geliştiğinden yapılan embriyolojik çalışmalar, neredeyse her cinste genellikle eksiktir. Bu ailenin cinslerinde hem allium hem de polygonum embriyo kesesi tipleri gözlenmiştir. Son kayıtlarda embriyo kesesinin endymion tipi de belirlenmiştir. Ovular, nadiren, bütüncül olmayan, tek ya da iki taraflı olarak, hemianatropous, anatropoustur. Bazı türlerde antipodların ikincil çoğalması bildirilmiştir. Antipod hücreler geçici veya kalıcı olabilir. Tomurcukların erken gelişim aşamaları yeraltında gerçekleşir. *L. aestivum*'un sadece endosperm oluşumu belirlenmiştir ve nükleerdir (Ekici ve Dane, 2008).

### 2.1.3. *Leucojum aestivum*'un genel özellikleri

*Leucojum aestivum*, beyaz çiçeklere sahip, bazal ve linear yapraklı, nodlu, çok yıllık soğanlı bir bitki türüdür (Şekil 2.3). *L. aestivum*'un soğan çapı, 18-45 mm; pedinkul kalın, içi boş bir yapıda olup iki kanatlı, uzunluğu 25-60 cm arasında; yapraklara eşit ya da yapraklardan uzun; yaprak sayısı 4 ile 6 arasında ; soğandan yukarı, dışa doğru büyüyerek aşağı doğru kıvrılır; yaprak uzunluğu 22-62 cm, genişliği ise 7-25 mm; çiçek durumu umbellattır; çiçek sayısı 2-5; çiçekler kampanulat ve eğik durumda, 6 tepalli ve her tepalin ucunda yeşil renkli bir benek bulunur; pedisel boyu 9-65 mm ve en uzun brakteye eşit ya

da brakteden daha uzun; spatula 22-51 mm, genişliği 3-8 mm ve valvli; meyva lokulusid; tohumda testa oldukça kalın olup hava dolu hücrelerden oluşur. Dışta 50-60 µm kalınlığında bir koruyucu tabaka bulunur; içte 0.37 mm kalınlığındaki endosperm tabakası yer alır. Meyva içinde 2-8 adet tohum içerir; tohumlar, siyah renkli ve çapları 5-8 mm (Ekici, 2006).

#### **2.1.4. *Leucojum aestivum* türünün kullanım alanları**

*Leucojum aestivum* (Göl Soğanı) ticareti yapılan soğanlı bir bitki olup Amaryllidaceae familyasına aittir. *L. aestivum* çok önemli tıbbi bir bitki olmasının yanında aynı zamanda değerli bir süs bitkisidir. Diğer bazı soğanlı bitkilerle birlikte ihraç edilmektedir. Avrupa ülkelerinde ise uzun zamandan beri süs bitkisi ve tıbbi bitki olarak kullanıldığı bilinmektedir. Son zamanlarda göl soğanının tıbbi bitki olarak kullanımı ön plana çıkmış ve önem kazanmaya başlamıştır. Türün hem soğanlarının hem de taze yeşil yapraklarının, başta galantamine alkaloidi olmak üzere önemli birçok kimyasal madde içerdiği bilinmektedir (Çiçek ve diğerleri, 2013). Bu alkaloidlerden dolayı familyanın türleri antitümör, antiviral, antimikrobiyal, tansiyon düşürücü, vücut dayanıklılığını artırıcı, safra salgısını azaltıcı, balgam söktürücü, ağrı kesici ve Alzheimer hastalığının tedavi edilmesinde kullanılmışlardır (Barthelmes ve diğerleri, 2001; Teuscher,1990; Koyuncu ve diğerleri,1994).

*L. aestivum* içerdiği çeşitli sekonder metabolitlerinden dolayı son günlerde oldukça ilgi çekmektedir. *Leucojum aestivum* 'un etanol ekstraktları antiviral etkilere ve galantamin, lektin, şelidonik asit gibi çok yönlü farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Odabaş, Çırak ve Ayan, 2005). *L. aestivum* türünün güzel ve gösterişli çiçeklerinden dolayı peyzaj düzenlemelerinde, kaya bahçelerinde, doğal ve yapay göllerde, havuzlar ve nemli alanlarda, ağaç ve çalılar ile birlikte bordürlerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Seyidoğlu, 2011; Arslan, 1998).



Resim 2.3. *Leucojum aestivum*'un çiçekleri

Başta Doğu Avrupa olmak üzere ilaç piyasasında artan talep bu bitkilerin doğal habitatlarından doğal kaynaklarının azalmasına ve sonunda yok olmasına sebep olacaktır. Bu sebeple bu değerli alkaloidi elde etmek için alternatif bir yol olarak *in vitro* kültürü kullanılarak galantamin elde edilebilir (Diop ve diğerleri, 2007).

Amaryllidaceae tipi alkaloidler antiviral ve antitümör özelliklere ve ayrıca antikolinesteraz aktivitesine sahiptir. Bu alandaki en çok çalışılan bileşik, Alzheimer hastalığının tedavisi ve ayrıca poliomiyelit ve diğer nörolojik hastalıkların tedavisi için tıpta yaygın olarak kullanılan güçlü bir asetilkolinesteraz inhibitörü olan galantamindir. Günümüzde, galantaminin izole edildiği bitkilerin listesi 20'den fazla türü kapsamakta ve yeni kaynaklar arayışı devam etmektedir. Galantaminin kimyasal sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olsa da yaz kar tanesi olarak da adlandırılan bir Avrasya-Akdeniz türü olan *L. aestivum* Bulgaristan'da Nivalin1 ticari adı altında galantamine bazlı ilacın üretimi için kaynaktır (İnce, 1989). Bu bitki türlerinin kullanımı için reçete rejimi uygulanmıştır ve bu perspektiflerden, *in vitro* kültürlerden galantamin üretimi cazip bir alternatif olarak kabul edilmektedir (Pavlov, Berkov ve Ivanov, 2007).

*Leucojum* türlerinin izolasyonu sonucunda birçok biyoaktif özellik gösteren bileşik bulunmuştur. Bulunan bu bileşiklerin antikolinesterazın, antibakteriyel, antifungal (mantara karşı), antimalarial, antiplatelet, insektisit (böcek öldürücü), sitotoksik etkilerinin



olduğu belirlenmiştir. *L. aestivum* türü başka hastalıkların tedavisinde de kullanılmasına rağmen öncelikli olarak Alzheimer hastalığının tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Alzheimer hastalığı, halen nöropatolojisi ve etiyolojisi net olarak ortaya konulamamış, ilaçla kökten tedavisi mümkün olmayan hastalıklar arasında yer almaktadır. Bu hususta hastalığın öncelikle kökten farmakolojik tedavisi önem kazanmaktadır. 19. yüzyılda insanların ortalama yaşam süresinin 50 yıl civarında olduğu bilinmektedir. 20. yüzyılda ise tıptaki gelişmelere paralel olarak mortalite hızı azalmış ve bunun sonucunda ortalama yaşam süresi 80'e yaklaşmıştır. Bir zamanlar bu hastalık çok nadir görülürken günümüzde dünyada 20-25 milyon civarında Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 65 yaşın üstündeki her 8 kişiden, 80 yaş üzeri her 2 kişiden birinin Alzheimer (AH) hastası olduğu bilinmektedir. ABD'de yaklaşık her 71 saniyede bir kişiye Alzheimer tanısı konulmaktadır. 2050 yılında ABD'de hasta sayısının 13,5 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise günümüzde yaklaşık 400 bin civarı Alzheimer hastası bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar *L. aestivum*'un farmakolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Amaryllidaceae familyasının bazı türlerinden elde edilen bir çeşit alkaloid olan galantaminin *L. aestivum*'da varlığı araştırılmıştır ve bu araştırmalar sonucunda bu maddenin ara metabolitlerinin özellikle çiçek sapı, ovaryum duvarı ve tepalde yoğun olarak bulunduğu saptanmıştır. Galantamin birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç hammaddelerinden biridir ve özellikle Alzheimer hastalığının tedavisinde pozitif etki göstermektedir (Karuncula, 2013). Galantaminin toplam sentezi, endüstriyel düzeyde bile olsa, tepkimelerin stereoselektivitesi ve düşük verimleri bu süreci ekonomik olarak itici hale getirmektedir (Schumann ve diğerleri, 2012).

## 2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller yüksek aktiviteli bileşiklerdir. Çevre kirliliği, radyoaktif ışınım, bitkilerin korunması için kullanılan ilaçlar, tütünün yanması sonucu oluşan duman, bozulmuş besinler ve insan vücudunda gerçekleşen metabolik olaylar sonucunda serbest radikaller meydana gelmektedir. Bu bileşiklerin insan vücudunda artması sonucu dengeler değişmektedir. Hücre zarının serbest radikallerin saldırısı ile zarar görmesi durumu oksidatif stres (gerginlik) olarak adlandırılmakta ve reaktif azot ve oksijen türlerinin insan vücudunda yüksek oranda bulunmasına bağlı olarak doku tahribatına, proteinlere etki ederek yapılarının bozulmasına, hücre mutasyonuna ve hücre ölümüne neden olan bir

süreçle sonlanmaktadır (Şimşekli, 2010). Oksidatif stresin neden olduğu hastalıklara astım, ateroskleroz, serebral vasküler hastalıklar, kronik obstruktif pulmoner hastalık, konjestif kalp yetmezliği, diyabet, grip, hipertansiyon, miyokard enfaktüs, hepatit, inflamasyon hastalıkları ve kanser örnek olarak verilebilir (Antmen, 2005).

Serbest radikaller, biyolojik sistemlerde daha çok elektron transferi ile oluşurlar ve pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler (Şimşekli, 2010). Serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Endojen kaynaklar; mitokondriyal elektron transport zinciri, redoks döngüsü, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz vs. gibi enzimler, fagositik (monosit ve makrofajlar vs.) ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır. Eksojen kaynaklar ise; çevresel faktörler (hava kirliliği), diyet faktörleri, ilaçlar, ksenobiyotikler ve zararlı ışınlar (X-ray, UV)'dır (Gümüştaş, 2008).

Aerobik metabolizmaya sahip olan memelilerde radikaller genellikle oksijenden üretilmektedirler (Orhan, 2011). Oksijenin dış yörüngesine bir veya birden çok eşleşmemiş elektron eklenmesiyle serbest oksijen radikali oluşur. Bu serbest oksijen radikali, yapısından dolayı kolaylıkla diğer moleküllerle reaksiyona girebilme, onları tahrip edebilme ve böylece organizmada çok ciddi hasarlar meydana getirmektedir (Şahin, 2010). Otooksidasyon, lipidler ile oksijen arasında UV ışığının etkisi ile oluşan serbest radikal zincir reaksiyonudur ve oldukça büyük zararlar vermektedir. Prooksidan etkenler başlangıç için gerekli olan aktivasyon enerjisini sağlamaktadır (Şensoy, 2006). Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler “oksidan” veya “prooksidan” olarak tanımlanmaktadır (Avcı, 2007).

Oksijen radikali serbest elektronu eşleştirmek için bir molekülden elektron aldığı zaman, elektron aldığı molekül elektronik düzenini sağlamak için başka bir molekülden elektron almak zorunda kalır. Böylece serbest radikaller organizmada önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilirler (Nakaç, 2010).

Serbest radikallerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır ve bunlardan bir kısmı radikal nitelikli iken bir kısmı da bazı reaksiyonlara katıldıktan sonra radikallere dönüşmektedir. Radikal olan reaktif oksijen türleri; süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil ( $ROOH^{\cdot}$ ), nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ), alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ) ve hidroperoksitlerdir. Radikal

olmayan reaktif oksijen türleri ise hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), azot dioksit ( $NO_2$ ), hipoklorik asit ( $HOCl$ ), lipid hidroperoksit ( $LOOH$ ), peroksinitrit ( $ONOO\cdot$ ), ozon ( $O_3$ ) ve singlet oksijendir ( $^1O_2$ ). Radikal olan reaktif azot türleri; nitrik-oksit ( $NO$ ) ve azot-dioksit ( $NO_2$ ); radikal olmayan reaktif azot türleri ise nitröz asit ( $HNO_2$ ), nitroksi anyonu, nitrozil katyonu, peroksinitrit, diazot tetraoksit, peroksinitröz asit, nitronyum katyonu ve alkilperoksinitritlerdir. Reaksiyonlar sonucunda oluşan en etkili serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROT)'dir. Organizmalardaki en aktif ROT üreticileri olarak bilinen fagositoz hücreleri uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) gibi ROT'ları oluştururlar. Diğer ROT kaynakları mitokondriyal elektron taşıma sistemi, doymamış yağ asitlerinin ve eşolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır (Boyalı, 2009).

Aerobik organizmaların yaşamlarını sürdürebilmesi için oksijen gereklidir. Organizmanın kendisi için gerekli enerjiyi sağlaması için oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçerek suyun yapısına katılmaktadır. Bu dönüşüm esnasında oksijenin bir kısmı su yapısına katılmaz ve oksijen kaynaklı radikaller oluşur. Bu reaksiyonlarda; oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle kuvvetli bir indirgeyici olan süperoksit radikali, iki elektron alıp indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Oksijene üçüncü elektronun eklenmesiyle yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikali ve dördüncü elektronun eklenmesi ile ise su oluşur (Görgü, 2011).

### 2.2.1. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerden etkilenmesiyle oluşan oksidasyon sonucunda gelişir ve oksidatif hasarın düzeyinin göstergesidir. Radikal, yağ asidi ile birleşerek bir dizi tepkimeyi başlatmaktadır. Bunun sonucunda ilk olarak lipid peroksit radikali ( $ROO\cdot$ ) oluşmakta, son ürün olarak da MDA oluşmaktadır. Bu molekül DNA ile tepkimeye girerek kromozomal yapıda değişiklikler oluşturmakta ve sitotoksisiteye neden olmaktadır. Ayrıca MDA'nın lipidlerde çapraz bağlanmalara neden olduğu, bunun dışında karsinojenik ve mutajenik olduğu da bilinmektedir (Nakaç, 2010). Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkmaktadır, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmasının yanında lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterdiği için biyolojik

materyalde malondialdehit (MDA) ölçümü, lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılmaktadır (Kıral, 2012).

### 2.2.2. Nitrik oksit (NO)

Memelilerde nitrik oksit ilk kez 1916 yılında tespit edilmiştir. Daha önceki yıllarda çevre kirleticisi olarak bilinen nitrik oksitin, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda vücut sistemlerinde meydana gelen biyolojik reaksiyonların büyük bir kısmıyla yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir. Moleküler oksijen varlığında L-arjininin L-sitrüline dönüştürülmesiyle nitrik oksit sentezlenmektedir ve bu sentezden sorumlu enzim nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinmektedir (Seyidoğlu, 2011; Paşaoğlu, 2011). NO yüksüz ve lipofilik olmasından dolayı membranlardan kolaylıkla geçerek etkili olabilmektedir. Organizmada düz kasların gevşemesinden nöronal fonksiyonların düzenlenmesine ve immün yanıtın sağlanmasına kadar birçok fizyolojik fonksiyonu yerine getirir ve antioksidan savunmaya destek olur. Ancak aşırı üretilmesi durumunda radikal etki göstererek peroksinitrit gibi radikalleri oluşturmaktadır. Peroksinitrit (ONOO<sup>•</sup>); hidroksil radikalleri (OH<sup>•</sup>) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluşturarak oksidatif hasar oluşturmaktadır. OH<sup>•</sup> ve ONOO<sup>•</sup> astım patogenezinde rol almaktadır; cGMP (cyclic Guanozin Mono Phosphate)'ı artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır (Boyalı, 2009). NO aracılığıyla oluşan DNA hasarı çekirdek içinde poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonuna neden olur. NAD tükenir ve bunun sonucunda hücre ölümüne yol açabilir. Ayrıca aşırı NO üretilmesinin enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği, antioksidanların azalmasına sebebiyet verdiği, lipid peroksidasyonunu indüklediği ve DNA'da mutasyonlara sebep olduğu bilinmektedir (Keser, 2005).

### 2.2.3. Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Süperoksit anyonu moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur ve oksijenden kaynaklanan radikallerin içerisinde en çok ve en kolay oluşan olmasının yanında diğer radikallerin de oluşmasına sebep olan radikaldir (Görgü, 2011). Süperoksitin başlattığı bir reaksiyon sonucu hidroksil radikali ortaya çıkmaktadır. Bu hidroksil radikali komşu olduğu her biyolojik molekülden bir elektron çekip alabilecek kadar güçlü olduğu için proteinlere zarar verebilmekte, DNA zincirinde kırılmalara sebep olabilmekte ve lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Bir hidroksil radikali ve moleküler oksijen bir

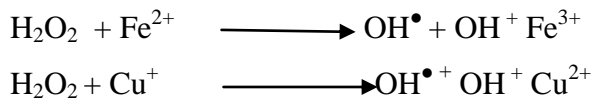
poliansature yağ asidi ile reaksiyona girerek yapısını ve fonksiyonel bütünlüğünü bozabilmektedir. Bu yağ asidi bir başka yağ asidi ile reaksiyona girebilmekte ve bu süreçte bir lipid hidroperoksitine dönüşmektedir. Bunun sonucunda bir tek serbest radikalın başlattığı reaksiyon yayılarak birçok yağ asidi peroksil radikallerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu peroksil radikalleri de diğer lipitler, proteinler, nükleik asit molekülleri ile reaksiyona girmektedir ve elektron transferleri çok yayılabilmektedir. Yağ asiti peroksit molekülleri kırılabilir, malondialdehit gibi dialdehitler ortaya çıkabilir ve böylece bunlar çeşitli moleküller arasında çapraz bağlanmalara neden olarak sitotoksositeye, mutajenliğe, hücre membranı kırılmalarına, enzim aktivitelerinin değişmesine neden olabilir (Bakkaloğlu, 2007).

Süperoksit radikali ayrıca mikrozomal ve mitokondriyal elektron taşıma sistemler içinde yer alan hücresel yollarda oluşturulmaktadır ve hem oksitleyici hem de indirgeyicidir. Süperoksit radikali oksijenin suya indirgenmesiyle oluşur ve bunu mitokondri dört elektron zincir reaksiyonu kullanarak gerçekleştirir. Mitokondri zincir reaksiyonlarından çıkan elektronların bazıları oksijenle tepkimeye girerek süperoksit anyonunu oluşturur (Keser, 2005). Süperoksit radikali protonlanarak oksidan perhidroksi radikalini ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) oluşturur. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali etkileşince bunlardan biri yükseltgenir diğeri ise indirgenir ve bu reaksiyon sonrasında moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir (Altaş, 2009).

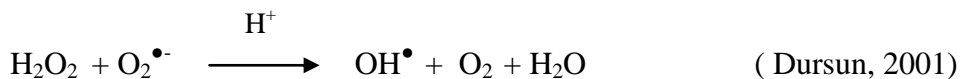
Süperoksit radikali Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları olarak bilinen reaksiyonlar sonucunda hidroksil radikaline dönüşür (Görgü, 2011). Bu reaksiyonlarda hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucunda hidroksil radikali açığa çıkar. Bu reaksiyonlar Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılır (Dursun, 2001).

Bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir:

*Fenton reaksiyonları:*



*Haber-Weiss reaksiyonu:*



Hidroksil radikali ise son derece etkilidir. Bundan dolayı süperoksit radikalinin bulunduğu ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için, süperoksit dismutaz enzimi önemli bir görev alır. Süperoksit dismutaz enzimi bu radikali zayıf etkili indirgeyici bir bileşik olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürür. Fakat aynı reaksiyonlar ile (Fenton ve Haber Weiss) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) molekülü de tekrar hidroksil radikaline dönüşebilmektedir (Görgü, 2011).

#### 2.2.4. Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ )

Oksijen radikalleri içerisinde yarı ömrü en kısa olanıdır ve bundan dolayı en reaktif radikaldir. En reaktif olmasından dolayı en toksik radikal olduğu için en yakın hedefleri bile kaynağından çok fazla uzaklaşmadan etkilemektedir (Boyalı, 2009). Hidroksil radikalının en önemli özelliği serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilmesi ve canlı hücrelerdeki bütün moleküllerle reaksiyona girerek okside olabilmesidir. Böylece lipid peroksidasyonunu başlatmakta ve DNA ayrılması, DNA-protein çapraz bağlanması, purinlerin oksidasyonu gibi ciddi hasarlar vermektedir. Eğer DNA onarım sistemi hemen DNA'yı rejenere edemezse mutasyonla sonuçlanmaktadır (Altaş, 2009). Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) ve süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatarak membran permeabilitesini artırır. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein, sülfidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olur ve yıkılır. Ayrıca nükleer ve mitokondriyal DNA da okside olur (Kıral, 2012).

#### 2.2.5. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )

Hidrojen peroksit, süperoksitin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu ya da oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ile oluşmaktadır. Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir ancak  $Fe^{2+}$  veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil radikalini oluşturduğu için ( $OH\cdot$ ) ROS kapsamına girmektedir ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol almaktadır (Altaş, 2009).

Hidrojen peroksit hücreler üzerinde toksik etkilere sahiptir. Hidrojen peroksitin çok düşük konsantrasyonlarında bile DNA harabiyeti gelişir. DNA harabiyeti, membran yıkımı ve

kalsiyum iyon salınımı ile hücre içerisinde kalsiyuma bağımlı proteaz ve nükleazların aktivasyonu hücre üzerindeki etkilerine örnek verilebilir (Pehlivan ve Uzun, 2015). Hidrojen peroksitin bütün elektronları çiftleşmiş olduğu için kendisi radikal olmayan küçük, yüksüz bir moleküldür. Ancak demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri ile etkileşerek yüksek reaktiviteli hidroksil radikalini oluşturabilir (Boyalı, 2009). Hidrojen peroksit DNA hasarını hidroksil radikali ile gerçekleştirir. Diğer önemli görevi ise intraselüler sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (Görgü, 2011).

### **2.2.6. Singlet oksijen ( $^1O_2$ )**

Moleküler oksijen radikal oksijen olarak nitelendirilir ve radikal moleküler oksijen diğer serbest radikallerle radikal olmayan maddelere göre daha kolay reaksiyona girmektedir. Singlet oksijen ise radikal oksijenin elektronlarından birinin enerji almasıyla kendi spininin ters yönünde başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur ve singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitallere geçebilmektedir ve DNA, RNA, lipitler ve proteinlerle reaksiyona girerek hücreye zarar vermektedir (Nakaç, 2010).

### **2.2.7. Ozon**

Ozon, atmosferde solar radyasyona karşı global bir antioksidan görevi yapmaktadır ancak yeryüzü seviyesinde oldukça toksiktir ve okside olabilen bir kirleticidir. Ozon, bazı fotokopi makinelerinde ve bilimsel ekipmanlarda kullanılan şiddetli ışık kaynağı ile oluşarak şehir havasını kirletmektedir. Bu molekül akciğerdeki lipitleri, çabuk okside olan proteinleri ve DNA'yı aşırı derecede zedeleyerek hasara neden olmaktadır (Doğan, 2007).

### **2.2.8. Egzersiz ve serbest radikaller**

Düzenli yapılan antrenmanlar antioksidan savunma mekanizmasını düzenlemekte ve yenilemektedir. Bundan dolayı antrenmansız kişilerde hücre hasarı daha çok olmaktadır. Bunda egzersiz tipi, süresi ve şiddeti lipid peroksidasyonunda önemlidir. Egzersiz, oksidatif stres oluşturarak ROS ve antioksidanlar arasındaki dengenin ROS tarafına kaymasına bağlı olarak dengesizlik oluşturmaktadır. Egzersiz sırasında oksijen üretimi artmaktadır ve bu da serbest radikal oluşumunu artırmaktadır. Egzersiz sırasında oksijenin

kısmi üretimi azalır ve bunun sonucunda süperoksitler, hidroksil radikaller ve hidrojen peroksit gibi metabolik ara ürünleri oluşturmaktadır. Bu da serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Yine egzersiz sırasında oluşturulan laktik asit hidroksile çevrilebilmekte ve hasar oluşturabilmektedir (Nakaç, 2010).

### **2.3. Serbest Radikallerin Oluşturduğu Oksidatif Hasar**

Serbest radikaller kısa ömürlü, kararsız ve bundan dolayı etrafındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron alıp bir an önce kararlı hale ulaşmak isteyen, molekül ağırlığı düşük moleküllerdir. Vücudun işlevini yerine getirebilmesi ve korunabilmesi için serbest radikallere gereksinim vardır. Serbest radikaller vücudu saran organizmaları yok ederek vücudun direncini artırırlar. Ancak fazla üretildiklerinde metabolik hasara neden olmaktadır. Serbest radikallerin hücrelerde protein, lipit, karbonhidrat ve nükleik asitler üzerinde önemli etkileri vardır (Kalaycı, 2009).

#### **2.3.1. Proteinler üzerine etkisi**

Serbest radikaller peptit bağlarını, prolin ve lizin gibi aminoasitleri oldukça kolay etkilerler. Daha çok sülfür içeren aminoasitler ve bazı diğer aminoasitler ile reaksiyona girerek enzimlerin aktivitelerini değiştirir ve işlev görmeyen proteinlerin oluşmasına neden olurlar. Proteinler hücrelerin yapı ve fonksiyonlarını yerine getirmede görev alan çok önemli makromoleküllerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapıları ve özellikle enzim ve reseptör fonksiyonuna sahip olan membran proteinlerinin fonksiyonları bozulmaktadır. Ayrıca serbest radikaller çapraz bağlanmalara yol açarak proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını bozar ve hücrelerin bu işlevleri yerine getirmesine engel olurlar. Bunların dışında protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları; proteaz inhibitör aktivitesinin kaybı, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, protein agregasyonu, gen transkripsiyonundaki değişimler, reseptör vasıtasıyla endositozun bozulması, immünojen aktivitedeki artıştır (Boyalı, 2009; Altaş, 2009).

#### **2.3.2. Karbonhidratlar üzerine etkisi**

Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrarlar ve bunun sonucunda süperoksit ile hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin



otooksidasyonu protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agregre olmalarına sebep olmaktadır. Ayrıca bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjyopati gelişimine de neden oldukları ileri sürülmektedir (Tekkeş, 2006). Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler oluşur (Altaş, 2009). Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etkili olmakta ve bu olaylar kanser ve yaşlanmaya neden olabilmektedir. Ayrıca bunlar çeşitli patolojik süreçlerde de etki göstermektedirler (Kıral, 2012). Bunların dışında diyabet komplikasyonlarının gelişimi, hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, behçet hastalığı, romatoid artrit ve kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (Aydın, 2011).

### **2.3.3. Lipitler üzerine etkisi (lipid peroksidasyonu)**

Lipitler, serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir ve hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedir. Bunun sonucunda peroksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonu membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonlarına neden olarak membran lipit yapısını değiştirir ve böylece hücre yapı ve fonksiyonları bozulur. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması ile lipid peroksidasyon reaksiyonları uyarılır. Doymamış yağ asitleri peroksidasyona özellikle hassastır. Lipid peroksidasyonunun başlaması, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisiyle, doymamış yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen karbonundan bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile gerçekleşir. Hidrojen molekülünün ayrılması, ayrıldığı yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olur ve oluşan lipit radikali dayanıksız bir yapıya sahip olması sebebiyle spontan değişikliğe uğrar. Lipit radikalinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucunda bir lipid peroksit radikali (LOO.) oluşur ve oluşan bu radikaller de membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına neden olur. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı zincirleme bir reaksiyon olduğundan direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehytlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir. Bunun sonucunda, doku hasarına ve birçok hastalığa neden olmaktadır. Aldehytler ise en toksik ürünlerdir. Malondialdehyt (MDA) ve lipid peroksidasyonunun diğer son ürünleri nispeten stabil olmaları nedeniyle hücrelerin daha uzak bölümlerine ya da diğer hücrelere ulaşabilmekte

ve lipid peroksidasyonu direkt olarak peroksidatif hasara maruz kalmayan dokulara da ulaşarak zarar verebilmektedir (Kıral, 2012).

Lipid peroksidasyonu sırasında yüzey reseptörleri inhibe olur ve hücrenin hormonal uyarılara cevap vermesi güçleşir. Bu süreçteki reaksiyonlar membranın anatomik bütünlüğünü bozarak veya toksik bileşikler oluşturarak hücre hasarına neden olmaktadır (Görgü, 2011; Nakaç, 2010). Oksidatif stresin artması ve normal hücrelerin yaşlanmasına ilave olarak olgunlaşmamış hücrelerin de erken yaşlanmasına sebep olur. Lipid peroksidasyonu kimyasal bir olaydır ve serbest radikaller tarafından başlatılarak hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda transport sistemi etkilenecek hücre içi ve hücre dışı iyon dengeleri bozulur. Örneğin hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak proteazlar aktive olur ve hücrede hasar oluşur (Boyalı, 2009).

Lipid peroksidasyonu-antioksidan dengesi hayatın her evresinde olduğu gibi hamilelik döneminde de annenin ve fetüsün fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için oldukça önemlidir. Hamilelik boyunca artan plasental lipoperoksidatif aktivite plasentaya ve fetüse olumsuz etkiler yapmaktadır. Bu yüzden antioksidan savunma sisteminin devreye girip girmemesi oldukça önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, lipid peroksidasyonundaki yükselmeye karşın antioksidan sistemin devreye girmediği durumlarda eksojen vitamin takviyesinin gerekebileceği belirtilmiştir ve böyle bir durumda hem annenin hem de fetüsün hayatı için koruyucu rol oynayabileceği belirtilmektedir (Berköz ve Yalın, 2009).

Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyon şeklinde devam ettiği için oldukça önemlidir. Lipid peroksidasyonu oksidatif stres ile oluşan hücre ölümünden sorumlu tutulmaktadır. Bu süreç, lipid molekülünde bulunan metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlamakta ve böylece lipid radikali oluşmaktadır. Bir sonraki adımda ise oluşan bu radikal oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksitlerini veya lipid hidroperoksitlerini oluşturmaktadır. Oluşan bu lipid peroksit radikali de diğer moleküllerle (protein, lipid, serbest radikal gibi) çeşitli zincirleme reaksiyonları aracılığıyla sürekli yeni radikaller üretmektedir (Nakaç, 2010).

### 2.3.4. Nükleik asitler ve DNA üzerine etkisi

Stabil bir molekül olan DNA da lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi oksidatif hasara uğramaktadır. ROS oluşumundaki artış, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması sebebiyle oksidatif DNA hasarı artmakta ve buna bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelmektedir. Bunlara ilave olarak, DNA ile protein arasında çapraz bağlanma oluşabilmektedir. Bu lezyonlardan bazıları, örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması gibi fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir ve insan genomunda gün içinde 104 kez meydana gelmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanır ve anti DNA antikorları oluşur (Doğan, 2007). Serbest radikallerin etkisi ile DNA'nın yapısında yapısal değişimler meydana gelir. Bu yapısal değişimlere örnek olarak zincir kırılmaları, sakkarit halkalarında kopmalar sonucu oluşan mutasyonlar, proteosentezde inhibisyon, purin ve pirimidin bazlarında parçalanma, bazlardaki modifikasyonlara bağlı olarak oluşan translasyon hataları ve DNA denatürasyonu verilebilir (Boyalı, 2009).

### 2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini (oksidatif hasarı) sınırlamak, kısmen tamir etmek ya da önlemek için oluşturulan savunma sistemleri olarak adlandırılmaktadır. Antioksidanlar etkilerini serbest radikal oluşumunu engelleme ve oluşan serbest radikallerin zararlı etkisini önleme olmak üzere iki şekilde göstermektedirler. Bunlardan serbest radikal oluşumunu engellemesini, oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak yada reaktif türevleri uzaklaştırarak gerçekleştirirken; oluşan serbest radikallerin zararlı etkisini önlemeyi ise bastırıcı, onarıcı, toplayıcı ve zincir kırıcı etkisiyle gerçekleştirmektedirler (Nakaç, 2010; Avcı, 2007).

Antioksidanlar vücudu serbest radikallerden ve ROS etkilerinden koruyarak birçok kronik hastalığın oluşmasını geciktirir ya da önlerler (Altaş, 2009). Serbest radikaller stabil değildirler çünkü negatif yüklü elektron sayıları, nükleustaki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit değildir. Ayrıca serbest radikaller elektron konfigürasyonlarını pozitif yüklerle yüklemeleri gerektiği için çok reaktiftirler (Nakaç, 2010). Serbest radikaller lipitler, proteinler, nükleik asitler veya DNA'yı okside edebilmektedir. Flavonoidler, polifenol ve

fenolik asit gibi antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirmektedir. Antioksidanlar, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere mekanizmalarına göre ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerler ve bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini önlerler. Böylece yeni serbest radikal oluşumunu önlemiş olurlar. Birincil antioksidanlara örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri verilebilir. Bu önemli enzim sistemleri ile serbest radikaller yok edilir. Bu enzimler serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrel bileşenlere zarar vermesini genelde sınırlandırır ve serbest radikallerin bir hücrel bölgeden diğerine geçişini önlerler. İkincil antioksidanlar etkilerini genellikle reaktif oksijen türlerine proton ilave edip aktivite kayıplarına neden olarak gösterirler (bastırıcı etki). Yani ikincil antioksidanlar oksijen radikalini yakalar ve radikal zincir reaksiyonlarını kırarlar. Ayrıca serbest radikal ve oksidan süpürücü etkileriyle de okside olur ve bileşikler koruyarak bazı antioksidanların rejenerasyonu sağlanmasını sağlamaktadırlar. Örneğin askorbik asit, E vitamini yapısını korur ve bu vitaminin antioksidan etki göstermesine yardımcı olur. İkincil antioksidanlara örnek olarak C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşikler verilebilir (Avcı, 2007; Çetinkaya, 2013).

Antioksidan maddelerin işleyiş mekanizmaları radikal zincir reaksiyon mekanizması ile gerçekleşmektedir. Bu zincir reaksiyon mekanizmasında, enerji emilimi ile aktive olan madde okside olmakta (oksijen ile birleşerek) ve aktif peroksit moleküllerini oluşturmaktadır. Oluşan bu peroksit molekülleri enerjilerini maddenin okside olabilen başka moleküllerine aktarmakta ve otooksidasyon böylece devam etmektedir. Antioksidanların görevi bu enerjinin başka moleküllere aktarılmasına engel olmak ve otooksidasyona uğrayan birçok molekülü oksidasyondan kurtarmaktır (Mortaş, 2012).

Günümüzde kullanılan antioksidanların çoğu sentetik olarak üretilmekte ve bunların dezavantajları bulunmaktadır. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), tersiyer butil hidrokinon (TBHQ), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve etoksigin gıdalarda kullanılan sentetik antioksidanlara örnek olarak verilebilir. Ancak sentetik antioksidanların kanserojenik olduğu düşünüldüğünden doğal antioksidanlara ilgi artmaktadır. Bitkiler potansiyel doğal antioksidan kaynağıdır. Flavonoidler, karotenoidler, folik asit, askorbik asit, sinamik asit, tokoflavonoid, benzoik asit, tokoferol ve tokotrienoller bitkiler tarafından üretilen antioksidanlar arasındadır. Bu fitokimyasal maddelerin serbest radikallerden koruma

aktiviteleri, DNA hasarını önlemede, kötü huylu kolesterol (LDL)'un oksidasyonu ve apoptozisi indüklemeye önemli olan bileşiklerdir (Kuş, 2012; Çetinkaya, 2013). Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur ve serbest radikaller lehine geliştiğinde hücre hasarına kadar dayanan patolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Antioksidan savunma mekanizmaları, SOR'nin fizyolojik seviyesi/reaktivitesini detoksifikasyon savunma mekanizmaları ile oldukça hassas bir şekilde dengelerler. Organizmanın sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için prooksidan-antioksidan dengesinin sağlanması ve korunması oldukça önemli ve gereklidir. Organizma oksijenle sürekli temas halinde olduğundan serbest radikal oluşumu da kaçınılmazdır. Serbest oksijen radikali oluşumunu artıran faktörler endojen ve ekzojen faktörler olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Görgü, 2011). Metabolizmada endojen kaynaklı birçok reaktif oksijen türü ve serbest radikaller oluşmakta ve bunların elektron transferi, enerji üretimi hücrelerarası iletişimi sağlama gibi birçok metabolik işlevde organizma için olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller başlıca mitokondride üretilirler ve fagositik bir hücre uyarısına maruz kaldığında biyolojik hedefleri yok etmek için oluşturulurlar. Eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir artış gösterirse hücrede hasarlara neden olur ve bu reaktif oksijen türü ve serbest radikallerin aşırı miktarda oluşması oksidatif stres, erken yaşlanma, doku hasarı, kronik hastalıklar (ateroskleroz, kanser, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi), hücre fonksiyonlarının bozulması ve biyokimyasal moleküllerinin bozulması ile birlikte birçok patolojik rahatsızlıkların oluşması gibi endojen kaynaklı radikallerin oluşumuna neden olur. Antioksidan moleküller, oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma sistemleri ile etkisiz hale getirmektedirler. Hücre içi savunmada serbest radikal toplayıcı enzimler rol alırken, hücre dışı savunmada albümin, bilirubin, seruloplazmin, ürik asit, transferin gibi moleküller rol almaktadır. Hemogloblin, seruloplazmin ve ağır mineraller antioksidan etkilerini zincir kırıcı etki adı verilen etkileriyle de gösterirler (Nakaç, 2010). Serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklı etmenlere kimyasal maddelere maruz kalma, bazı enzimatik reaksiyonlar, UV ışınları, yanlış ve yetersiz beslenme (düşük antioksidan ve fazla yağ alımı), yiyeceklerin uygun olmayan ortam ve koşullarda hazırlanması, sigara, alkol, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, pestisitler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksisiteleri, ksenobiyotikler ve kanserojen maddeler örnek verilebilir (Tazeoğlu, 2011).

Vücut endojen antioksidanların yetmediği durumlarda fenolik bileşikler, karatenoidler, glutasyon (GSH), ürik asit (ürat), bilirubin, melatonin, seruloplazmin, transferin, ferritin, C ve E vitaminleri gibi ekzojen antioksidanlara ihtiyaç duymaktadır. Lignoselülozik materyallerden elde edilen fenolikler, doğal antioksidan özellikleriyle gıda katkı maddesi olarak, sağlık alanında ve kozmetik ürünlerinde kullanılabilir. Fenolik bileşikler, sekonder aromatik bileşiklerdir ve serbest radikalleri bağlamak, lipoksigenaz enzimini inaktive etmek ve metallerle şelat oluşturmak suretiyle antioksidan etkilerini göstermektedirler. Bu bileşikler antialerjik, antimikrobiyal, antienflamatuar, antidiyabetik, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik etkiye sahip olup aynı zamanda kalp hastalıkları, Alzheimer, kanser ve katarakt gibi göz hastalıklarını engellediği görülmüştür. Antioksidan maddeler aynı zamanda cilt sağlığı açısından da önemli etkiye sahiptirler (Şensoy, 2006).

## **2.5. Yapılarına Göre Antioksidanlar**

Vücudun ürettiği serbest radikallere (oksidanlara) karşı, etkinliği antioksidan maddeler tarafından sağlanan ve savunma mekanizması olarak görev yapmakta olan bir enzim sistemi bulunmaktadır (Şensoy, 2006). Antioksidanlar yapılarına göre enzim karakterli olanlar ve enzim karakterli olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

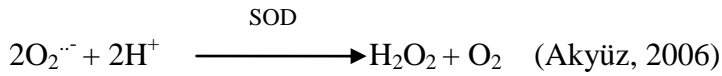
### **2.5.1. Enzimatik antioksidanlar**

Organizmalar serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek için süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GSH-Rd), glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD), paraoksonaz (PON), sitokrom-C-oksidaz, hidroksiperoksidaz gibi enzimleri içeren endojen kaynaklı savunma mekanizmalarına sahiptir. Böylece bu enzimler sayesinde canlılardaki serbest radikaller nötralize edilerek canlıların serbest radikallerden etkilenmeleri önlenmekte ve oksidan/antioksidan dengesi sağlanmaktadır (Pehlivan ve Uzun, 2015).

#### Süperoksit dismutaz (SOD)

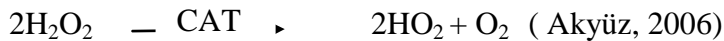
1968’lerde SOD olarak gösterilen ve süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimin tanınmasıyla birlikte reaktif oksijen metabolitleri yoğun ilgi çekmeye başlamıştır. Antioksidan mekanizmalar, reaktif oksijen metabolitlerinin toksik etkilerini engellemek

amacı ile çalışmaktadırlar. SOD enzimi bunlardan en önemlisidir ve süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırmakta görev alır. Oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle süperoksit radikali oluşur ( $O_2^{\cdot-}$ ). Bu radikalin ortadan kaldırılması süperoksit dismutaz adı verilen enzim ile gerçekleştirilmektedir. Bu reaksiyon sonucunda bir süperoksit radikali oksijene yükseltgenir ve başka bir süperoksit radikali hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) indirgenir (Pehlivan ve Uzun, 2015). Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir:



### Katalaz (CAT)

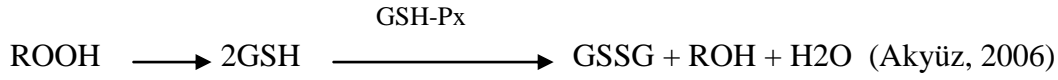
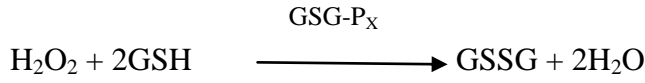
Katalaz enzimi esas olarak peroksizomlarda bulunmaktadır. Bunun dışında daha az konsantrasyonlarda olmak üzere sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. CAT, lipidlerin  $\beta$ -oksidasyonunda ve solunumda üretilen  $H_2O_2$ 'yi temizleyerek, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz ile birlikte hücre içerisinde oluşan reaktif oksijen metabolitlerini değişime uğratar ve hücre dışına atar (Keser, 2005). Böylece bu bileşikler, antioksidan savunmanın başlamasında ilk basamağı oluştururlar (Pehlivan ve Uzun, 2015). Katalaz hücrede oluşan hidrojen peroksitin daha etkili radikal olan hidroksil serbest radikale dönüşmesini engeller (Kıral, 2012). Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşir:



### Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz; hidrogen peroksit, lipid hidroperoksitleri ve peroksinitril olmak üzere üç reaktif tür ile ilgili detoksifikasyon aktivitesine sahiptir (Altaş, 2009).

Sitozol ve mitokondride yer alan bu enzim, redükte glutatyonun okside glutatyona dönüştüğü reaksiyonda hidrojen peroksiti kullanarak bu serbest radikalın hücre içerisinde birikimine engel olur. Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz enzimi vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur ve eritrositlerde oksidatif strese karşı etkilidir (Pehlivan ve Uzun, 2015; Kıral, 2012). Enzim tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir:



### Glutatyon redüktaz

Glutatyon redüktaz, hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH)'a dönüşümünde rol almaktadır (Kıral, 2012). Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir:



### Glutatyon S-transferazlar

Glutatyon S-transferazlar lipid peroksitlerine karşı bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. GST'lar, katalitik ve katalitik olmayan birçok fonksiyona sahiptir. Bu enzimler detoksifikasyon yaparlar, ayrıca hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır. GST'lar, karaciğerde reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalize ederler (Kıral, 2012).

### Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksit radikalini detoksifiye eder (Kıral, 2012)

## **2.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar**

### Askorbik asit (C vitamini)

Vitamin C, kan ve plazmada serbest radikallere karşı ilk savunmayı sağlar ve lipid peroksidasyonunu engeller. Ayrıca vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlayarak antioksidan etkinliğini artırır. Hidroksil radikal gidericidir ve tokoferolü indirger ve kollagen



sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir (Derviş, 2011; Aydemir ve Sarı, 2009). Fizyolojik faaliyetlerin yerine getirilmesinde oldukça önemli olan askorbik asit insanlarda sentezlenemez, bunun için dışarıdan alınması gerekir. Bu vitamin; kollajen sentezinde, karnitin üretiminde, tirozin yıkılım reaksiyonlarında, safra asidi oluşumunda, demir emiliminde, steroid bileşiklerin sentezinde ve antioksidan mekanizmalarında oldukça gerekli ve önemlidir. E vitamini yapı itibariyle basit bir vitamindir. Suda çözünebilir, ince bağırsaktan kolayca emilir, kanda ve hücre dışı sıvısında serbest halde bulunur. Ayrıca çoğu doku ve plazmada askorbat şeklinde bulunur ve ısıyla ya da hava basıncıyla kolayca parçalanabilen bir vitamindir (Doğanay, 2014).

### Karotenoidler

Karotenoidler, yağda çözünebilir ve hem bitkileri hem de hayvanları oksidatif hasara karşı koruyan çözünebilir moleküllerdir. Bitki karotenoidleri kloroplastlarda ve kromoplastlarda isopentenil difosfattan meydana gelir ve kloroplastlarda ışık toplama özelliğine sahip yardımcı pigmentlerdir (Keser, 2005). Karotenoidler; hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri ile etkileşime girerler ve yapılarındaki çift bağların eşleşmemiş elektronlara bağlanmasıyla antioksidan etkilerini gösterirler. Yüksek konsantrasyonları ise, lipitleri peroksidasyondan korur (Derviş, 2011; Özel ve Birdane, 2014).

### Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)

Tokoferoller, başlıca bitkisel ürünlerde mevcut iken hayvansal organizmalar çok az miktarda tokoferol içermektedir. Özellikle bitkisel yağlarda, baklagillerde, yeşil yapraklı sebzelerde, süt, yumurta, fındık ve cevizde bulunurlar. Tokoferollerin kimyasal yapıları birbirine benzemesine rağmen biyolojik etkileri oldukça farklıdır. Bunlardan 'E-vitamini' denildiğinde  $\alpha$ -tokoferol anlaşılır ve 3 metil grubu taşıyan  $\alpha$ -tokoferol vitamin olarak en etkili olanıdır. Tokoferollerden  $\beta$  ve  $\gamma$  tokoferoller,  $\alpha$  izomerinin yarısı kadar etkilidir.  $\delta$  izomeri ise ancak yüzde biri kadar etkilidir. Tokoferoller, monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır ve doğada 7 farklı izomer yapısına sahiptirler (Apak, 2012). E vitamininin en aktif formu  $\alpha$ -tokoferoldür. Tokoferoller, antioksidatif aktivitelerini hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek göstermektedirler. Aynı zamanda  $\alpha$ -tokoferolün hidroperoksitlerin dekompozisyonunu yavaşlattıkları ve oksidatif kararlılığı artırmada ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltmada etkili oldukları

bildirilmiştir. Tokoferoller ısıya karşı oldukça dayanıklıdırlar. Oksidatif stabiliteyi artırmada etkili olan bu bileşiklerin sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azalttıkları bildirilmiştir (Dursun, 2001; Şimşekli, 2010 ).

E vitamini mitokondri ve mikrozoimler gibi zarlı yapılarda ve miyokard membranlarda oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. En önemli depo yeri yağ dokusudur. E vitamini lipid peroksidasyonuna karşı C vitamini ile birlikte çalışarak E vitamininin rejenerasyonunu sağlar ve membran yağ asitlerini lipid peroksidasyonundan korur (Doğanay, 2014; Derviş, 2011). Bu vitamin, zincir kırıcı antioksidan olarak görev yapar ve serbest radikalleri etkisiz hale getirir. E vitamini çok güçlü bir antioksidan maddedir ve bu sayede hücrel membran fosfolipitlerinde çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden korur. Ayrıca serbest radikalleri stabil hale getirerek peroksidasyon zincirini kırar ve böylece güçlü bir serbest radikal olan singlet oksijeni daha az etkili olan hidroksil radikaline ya da süperoksit radikaline indirger (Doğanay, 2014).

### Polifenoller

Polifenoller insan yaşamında gerekli olan ve fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan bileşiklerdir. Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve bitki polifenollerini indirgeme aracı, singlet oksijen söndürücü ve hidrojen atom-donör antioksidanlar olarak, bazıları da metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak görev yapmaktadırlar. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için, polifenolün okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulunduğu, serbest radikal merkezli oksidasyonu ya da otooksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir. Ayrıca süpürme sonunda oluşacak olan radikal oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır ( Apak, 2012).

Polifenoller (hidroksi benzenler) insan ve hayvan diyetleri içerisinde bulunan ve özellikle iki ve daha çok fenol grubu içeren bitki bileşikleridir. Vitaminler ve mineraller gibi en geniş olarak göze çarpan diyet gruplarıdır. Günümüzde 8000'den fazla polifenol türevli madde bilinmektedir ve bitki yapılarında basit fenollerden en karmaşık yapıya sahip olan tanninlere kadar geniş bir yelpazede bulunmaktadır. Flavonoidler, polifenol yapıları içerisinde biyolojik aktiviteleri olan en önemli ve yaygın olan bileşiklerdir ve bitkilere renk

verici pigmentlere sahiptirler. Bu grupta bulunan yaklaşık 5000 madde bilinmektedir. Flavonlar, flavonollar, izoflavonoidler ve proantosiyanidinler flavonoidlerin en önemli alt sınıflarıdır (Avcı, 2007).

### Fenolik asitler

Sinamik ve benzoik asitler olmak üzere fenolik asitler iki gruptan oluşmaktadır. Sinamik asitlerin yapısı C6-C3 iskeletine dayanmaktadır. Kafeik asit, kumarik asit ve ferulik asit meyvelerde en fazla görülenleridir. Sinamik asitler meyvelerde esterleşmiş halde de bulunabilmektedirler. Benzoik asitler ise C6-C1 iskelet yapısına sahip fenolik asitlerdir. Benzoik asit türevleri meyvelerde genellikle ester halinde bulunurlar. Salisilik asit (2 hidroksibenzoik asit), protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit), p hidroksibenzoik asit (4-hidroksibenzoik asit), gallik asit (3-4-5- trihidroksibenzoik asit) ve vanilik asit (3-metoksi-4-hidroksibenzoik asit) en önemli benzoik asit türevleridir. Hidroksisinamik asitlerden en yaygın şekilde bulunanları p-kumarik asit, sinamik asit, kafeik asit ve ferulik asittir. Kinik asit genellikle tartarik asit gibi organik asitler ve şekerler ile esterleşmiş halde bulunmaktadır ve içinde en bilinen yapısı klorojenik asittir. Hidroksibenzoik asitler ise gıdalarda genellikle şekerler, organik asitler ve ligninler gibi maddelerle esterleşmiş halde ve suda çözünür formda bulunurlar ve bunlar içinde en bilinenleri gallik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asittir. Flavonlar ve fenolik asitler lifli materyallerde zengin bir içeriğe sahiptirler. Kumarik asit ve ferulik asit gibi fenolikler düşük antioksidan aktivite göstermektedirler. Gallik asit ve esterleri ise güçlü antioksidanlardır. Gıdaların içerisinde bulunan toplam fenolik miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından oldukça önem taşımaktadır (Avcı, 2007).

### Flavonoidler

Flavonoidler bitkilerden elde edilen ve genellikle sarı renkli olan bileşiklerdir. Yapılan çalışmaların sonucunda, bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve bunların yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bunların hepsi antioksidan aktivite göstermektedirler. Flavonoidlerin çoğu polifenolik bitki pigmentidir ve çoğu meyve ile sebzelere kırmızı, sarı, turuncu, mavi ve mor renk vermektedirler (Avcı, 2007). Flavonoidlerin lipid peroksidasyonunu engelleme, metal şelatlama ve reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır (Apak, 2012).

Flavonoidler aromatik halka yapılarındaki hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek redoks reaksiyonlarına girer ve serbest radikalleri yok ederler. Ayrıca aromatik heterosiklik ve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla dayanıklı bir kimyasal yapı oluşturarak güçlü antioksidan özellik gösterirler. Flavonoidler birincil antioksidanlar olarak, şelatlayıcı olarak ya da süperoksit anyon yakalayıcısı olarak etki göstererek serbest radikallerin etkisini gidererek genellikle üç türlü antioksidan aktivite göstermektedirler. Flavonoidlerin yapılarında bulunan hidroksil grupları en yaygın süstitüentlerdir ve doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubu bulunmaktadır. Flavonoidlerin yapısındaki bu hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla alkilenir veya glikozillenirler ve bu sebeple flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde oldukça sık rastlanmaktadır. Flavonoidler bitkilerde glikozitler olarak birçok meyve sebzelerde bulunmaktadır (Avcı, 2007).

#### Transferin ve laktoferrin

Transferin, kanda demir taşıyan bir  $\beta$ -globindir ve serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonlarını inhibe etmektedir. Laktoferrin ise dolaşımdaki serbest demiri düşük pH'larda bağlayarak etkili olmaktadır (Akyüz, 2006; Antmen, 2005). Apolaktoferrin, serbest demiri bağlayarak  $H_2O_2$  ve süperoksitten hidroksi radikal oluşumunu baskılamakta ve bundan dolayı yangı bölgesinde laktoferrinin bulunması hücrelerin hasar görmesini sınırlamaktadır. Özellikle hücre membran lipidlerinin peroksidasyonunu engelleyerek aktivite göstermektedir (Avcı, 2007).

#### Seruloplazmin (Cp)

Seruloplazmin, total serum bakırının yaklaşık %95'ini içeren  $\alpha_2$ -globulindir ve primer fizyolojik rolü ise plazma redoks reaksiyonları ile ilişkilidir. Oksidan veya antioksidan işlevini serbest ferrik iyonları ve ferritin bağlayan bölgelerin varlığı gibi faktörlere bağlı olarak gerçekleştirmektedir. Seruloplazminin demirin iyonik durumunu düzenlemede görev alması ve toksik demir ürünleri oluşmaksızın demirin transferine girmesinde etkili olması nedeniyle yaşamsal öneme sahip bir moleküldür (Antmen, 2005). Seruloplazmin, ferro demiri ( $Fe^{+2}$ ) ferri demire ( $Fe^{+3}$ ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu destekler ve böylece hidroksil radikali oluşumunu önleyerek etki gösterir (Demir, 2011).

### Albumin

Albumin, önemli bir hücre dışı antioksidandır ve lipid oksidasyon oluşumunu önlemektedir. (Demir, 2011).

### Ürik asit

Ürik asit, insanlarda pürin nükleozidleri olan adenozin ve guanozin katabolizmasının temel ürünüdür. Ürik asit metal bağlayıcı ve serbest radikal temizleyicisi olarak görev almaktadır. İnsan dokuları urat oksidaz içermediği için pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit birikmektedir. Ürik asit; singlet oksijen, peroksil radikalleri, HO<sup>•</sup> ve ozon için güçlü bir temizleyicidir ve oldukça etkili bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Ürik asit genelde metal bağlayıcı olarak görev almakta ve değişik radikalleri de biriktirmektedir (Demir, 2011; Akyüz, 2006).

### Bilirubin

Bilirubin, önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır ve etkisini peroksil radikalini yok ederek göstermektedir. Bilirubinin büyük bir kısmı ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanması ile oluşmaktadır. Dolaşımdan karaciğer tarafından alınarak biyotransformasyona uğramakta son olarak ise safra ve idrarla dışarı atılmaktadır (Akyüz, 2006; Antmen, 2005).

### Melatonin

Melatonin, HO<sup>•</sup>'i temizleyen güçlü bir antioksidandır. Melatonin, HO<sup>•</sup> ile reaksiyona girdikten sonra bir indolilkatyon radikaline dönüşmektedir ve buda ortamdaki O<sub>2</sub><sup>-</sup> tutarak antioksidan etki göstermektedir. Lipofilik bir madde olmasından dolayı kan-beyin bariyeri de dahil birçok kompartmana yayılmakta ve geniş bir antioksidan aktivite göstermektedir. Bu özellik diğer antioksidanlara karşı melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır. Melatoninin diğer bazı antioksidanlar gibi prooksidan etkisi bulunmamaktadır. Melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve dolayısıyla antikanserojen olduğu bilinmektedir. Ayrıca, melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif

hasardan koruması bakımından diğer antioksidanlara göre melatonine üstünlük kazandırmaktadır (Demir, 2011).

### Ubikinonlar

İnsanlarda bulunan temel ubikinon yapısı ubikinon 10 (koenzim Q)'dur ve elektron taşıma zincirinde görev yapmaktadır. Ayrıca da E vitamininin rejenerasyonund görev almaktadırlar (Devrim, 2005).

## **2.6. Antioksidan Aktivitenin Saptanmasına Yönelik Metodlar**

Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla günümüzde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bir kısmı hidrojen atomu transferi (HAT, Hydrogen Atom Transfer) reaksiyonu iken diğer bir kısmı ise elektron transferi reaksiyonudur (ET, Electron Transfer). HAT'ne dayalı antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinde antioksidanlar peroksi radikali ile reaksiyona girerek okside olmakta ve bu sırada lipidlerin peroksidasyonunu önlemektedirler. HAT'ne dayalı yöntemler arasında; toplam radikal tutma antioksidan parametresi (TRAP, Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) yöntemi ile oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC, Oxygen Radical Absorbance Capacity) yöntemleri yer almaktadır. ET'ne dayalı yöntemlerde, renkteki değişim ile örnek içinde bulunan antioksidan miktarı arasında ilişki bulunması sebebiyle antioksidan tarafından indirgenen oksidanın rengine meydana gelen değişimler çok önemlidir. ET'ne dayalı yöntemler arasında; difenil-1-pikrilhidrazil radikal tutma kapasitesi (DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay), troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (ABTS/TEAC), ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (FRAP, Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ve N,N-dimetil-p-fenilendiamin analizi (DMPD, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine assay) yöntemleri yer almaktadır (Apaydın, 2008).  
Önemli antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerine örnekler aşağıda verilmiştir:

### **2.6.1. TRAP metodu**

TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) yönteminde, 2,2- azo-bis-2-amidinopropan hidroklorit'in (ABAP) ısı etkisi ile parçalanmasıyla peroksi radikalleri

oluşmakta ve oluşan bu peroksi radikalleri kimyasal aydınlatıcılar izlemektedir (Apaydın, 2008).

### 2.6.2. ORAC metodu

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) yönteminde, antioksidan içeren örneğe peroksi radikali üretmek için önce 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) eklenmesinin ardından B-fikoeritrin veya R-fikoeritrin gibi florosan veren bileşikler eklenerek serbest radikal inhibisyonu ölçülmektedir (Apaydın, 2008).

### 2.6.3. ABTS/TEAC metodu

En çok kullanılan antioksidan aktivite ölçüm metodlarından birisi olan ABTS/TEAC yöntemi ABTS'nin (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Oluşan bu ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren örneğin eklenmesi ile ABTS<sup>•+</sup> radikali indirgenir. Bu radikalin indirgenmesi ve oluşan mavi/yeşil renkli ABTS<sup>•+</sup> radikalinin renginin 600–750 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanan bir metottur. Reaksiyon sonucu harcanan ABTS<sup>•+</sup> miktarı, troloks eşdeğeri olarak hesaplanmaktadır. Elde edilen sonuç “TEAC değeri” (Troloks eşdeğeri) olarak ifade edilmektedir. ABTS<sup>•+</sup> radikali; 414, 645, 734 ve 815 nm dalga boylarında absorbans vermekte ve antioksidan aktivite belirlenirken 734 nm’de ölçüm yapılmaktadır. ABTS çözeltisinden ABTS<sup>•+</sup> radikali oluşturmak için MnO<sub>2</sub>, potasyum persülfat ve peroksit radikalleri kullanılarak kimyasal olarak veya miyogloblin ve bayır turbu peroksidazı kullanılarak enzimatik olarak elde edilmektedir (Apaydın, 2008).

Örneğe ait yüzde inhibisyon değeri aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır:

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

Burada;  $A_{\text{kontrol}}$ , kontrolün absorbansını ve  $A_{\text{örnek}}$ , örneğin absorbansını ifade etmektedir (Apak, 2012).

#### 2.6.4. DPPH metodu

Bu yöntemde kullanılan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali, yapısında azot içeren stabil (kararlı) ve ticari olarak üretilen çok az sayıdaki radikallerden bir tanesidir. DPPH radikali mor renklidir ve 515 nm’de maksimum absorbands vermektedir. DPPH radikali, antioksidan maddenin hidrojeni ile birleşmekte, tek elektronu indirgenmiş DPPH-H’i oluşturmaktadır. Bu esnada DPPH radikalinin 515 nm’deki molar absorpsiyon katsayısı düşmekte ve bunun sonucunda renk mordan sarıya dönüşmektedir (Apaydın, 2008).

#### 2.6.5. FRAP metodu

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) metodu: Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde demir (III)’in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. FRAP metodu oksidan olarak kullanılan ferrik-tripiridilriazin kompleksinin, antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu renkli formdaki ferro ( $Fe^{2+}$ ) formuna indirgenmesi yöntemidir. FRAP yöntemi ile ferrik indirgeme yeteneğine sahip antioksidanların konsantrasyonu, 1 mmol L<sup>-1</sup> demir sülfata ( $FeSO_4$ ) eşdeğer olarak belirlenir. FRAP yöntemi kolaylıkla standardize edilebilen nispeten basit bir yöntemdir. Bu yöntemin dezavantajı, bazı antioksidanlarla (glutatyon gibi) çok yavaş reaksiyona girmesidir. (Apaydın, 2008).

#### 2.6.6. DMPD metodu

DMPD yöntemi, N, N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) radikalinin 0.2–11 g troloks varlığında stabil bir renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Antioksidan içeren bir örnek eklenerek oluşan rengin kaybolma süresinin ölçülmesi ile hidrofilik grupların antioksidan aktivitesinin duyarlı ve hızlı bir şekilde belirlenmesi sağlanmaktadır (Apaydın, 2008).

### 2.7. Ekstraksiyon

Çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi ayırmak ya da çözücü ile istenmeyen safsızlıkları karışımdan uzaklaştırmak için yapılan işleme çekme denilmektedir. Çekmedeki amaç, fazla çözücü harcamadan organik maddeyi ayırmaktır (Önmez, 2007).



Ekstraksiyon bir bileşigi bir karışımdan uygun bir çözücü ile ayırma işlemidir. Ekstraksiyon gıda bileşenlerinin geri kazanımında ve bazı gıda ürünlerinin (protein, yağ, şeker) eldesinde özellikle antioksidan ve aroma maddeleri gibi istenilen bazı ürünlerin izolasyonu yanında bazı kontaminantların, alkaloidlerin ve kolesterol gibi istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Ayırma işlemi için çoğunlukla bir sıvının kullanılması uygundur. Genellikle katı maddelerde iki fazın birbirinden ayrılması basit bir çöktürme işlemiyle yapılmaktadır (Dursun, 2001).

## 2.8. Sokslet Ekstraksiyonu

Sokslet düzeneği balon, gövde ve geri soğutucu olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Sokslet düzeneğinde balonda kaynayan çözücü soğutucuda yoğunlaşmakta, organik maddeyi içeren katının içinden damlalar halinde geçerek tekrar balona dönmekte ve daha sonra sifon yaparak balonun içine akmaktadır. Balonda kaynayan organik çözücü içindeki organik madde miktarı ise zamanla artmaktadır. Ekstraksiyon yapmak için sokslet cihazı kullanılarak az çözücü ile fazla miktarda madde elde edilmektedir (Dursun, 2001).



Resim 2.4. Sokslet düzeneği

Bu ve benzeri yöntemlerde; uzun ekstraksiyon süresi, oransal olarak yüksek miktarda organik çözücü tüketimi, emek, yoğun işlem basamakları ve düşük tekrarlanabilirlik gibi dezavantajlar söz konusudur. Buna bağlı olarak laboratuvar otomasyonu kavramı

yerleşmektedir ve klasik ekstraksiyon teknikleri giderek önemini yitirmektedir. Yatırım maliyetleri dışında pek çok avantajları olduğu ve minimum düzeyde muamele gerektirdiği için enstrümental ekstraksiyon tekniklerine ilgi giderek artmaktadır. Birçok yönden ideal bir ekstraksiyon tekniği olmamasına rağmen sokslet ekstraksiyonu metodu 100 yılı aşkın bir zamandır yaygın bir şekilde kullanılan basit bir cihazdır. Ekstraksiyon süresi ise 1 ila 72 saat arasında değişmektedir. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra çözeltiyi konsantre etmek için döner buharlaştırıcılar (rotary evaporatörler) ya da kızgın yüzeyli ısıtıcılar kullanılabilir. Çözücünün ısıtılması esnasında istenilen analitin ekstraksiyonunu engelleyen veya azaltan durumlar olabildiği için çoğu durumda sokselet cihazı ile ekstraksiyon seçici değildir. Isıtma esnasında düşük molekül ağırlığına sahip poliaromatik hidrokarbonlar gibi uçucu olan analitlerin kaybolmasına neden olabilir. Ayrıca, ekstrakt derişiminin artırılması esnasında da uçucu olan analitlere dikkat edilmelidir. Ekstraksiyon sıcaklığı kadar çözücü seçimi de önem taşımaktadır. Sokslet ekstraksiyonunda bazı durumlarda yüksek sıcaklıkta analit bozulabilmekte veya çözücü ile analit reaksiyona girebilmektedir. Sokslet ekstraksiyonunun en önemli dezavantajlarından birisi ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin toksik ve pahalı olmasıdır. En önemli avantajı ise çoklu ekstraksiyonun yapılabilmesidir. Katı ve yarı katı gıdaların hedef bileşenlerinin ekstraksiyonu için sokselet ekstraksiyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Katı ve yarı katı gıdaların analizleri, sıvı gıdalara oranla genellikle daha zor olmaktadır. Ekstraksiyon metodu oldukça fazla organik çözügen kullanımı gerektirmesi, yavaş ve bazen de ekstraksiyonda yetersizlikler gösteren bir yöntem olması gibi sınırlayıcı faktörlerden dolayı son yıllarda bazı ekstraksiyon teknikleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Organik çözügen tüketimini azaltarak çevre kirliliğini önleyen ve ekstraksiyon süresini kısaltan yeni ekstraksiyon metotları geliştirilmiştir. Geliştirilen tekniklerde ekstraksiyon süresi büyük oranda azalmaktadır (Dursun, 2001).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hexane (Sigma)

Etanol (Sigma)

Metanol (Sigma)

EDTA (Sigma)

Agarose (Sigma)

Nutrient broth (Merck)

TCA (Merck)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma)

Gel loading solution (Sigma)

Ethidium bromide (Sigma)

$\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$  (Sigma)

$\text{C}_6\text{FeK}_3\text{N}_6$  (Sigma)

Ferrozine (Sigma)

$\text{FeCl}_3$  (Sigma)

DPPH (Sigma)

#### 3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar



Resim 3.1. Bu çalışmada bitki örneklerinin öğütülmesi için Fritsch pulverisette 16



Resim 3.2. Fonksiyonel grupları görüntülemek için Perkin Elmer Frontier FT-IR Spektrofotometresi (Infrared Spektrum)



Resim 3.3. Camag UV kabin



Resim 3.4. Antimikrobiyal aktivite analizlerinde sterilizasyon için Nüve Steam Art (OT-106) otoklav



Resim 3.5. Bakterileri büyütmek için WiseBath (Feedback Control Digital Timer Function) su banyosu



Resim 3.6. İnkübasyon için Nüve ES 500 ve FN 500 etiv



Resim 3.7. Standart grafiklerin oluşturulmasında ve örnek çözeltilerinin absorbanlarının ölçülmesinde Genesys 10S UV-VIS spektrofotometre



Resim 3.8. İlgili çalışmalar esnasında tüm tartımlar Precia 205 A hassas terazi



Resim 3.9. Tüm pH ölçümleri HQ40d multi pH-metre



Resim 3.10. Karıştırma işlemleri Stuart Orbital Shaker SSL1



Resim 3.11. IKA RH basic 2 ısıtıcılı manyetik karıştırıcı



Resim 3.12. Saf su Sanyo Gallerkamp PLC saf su cihazı



Resim 3.13. Estrelerin DNA analizleri için; Arçelik MD 574 Mikrodalga





Resim 3.14. OWV™D2 model yatay elektroforez



Resim 3.15. PeQPOWER 300V elektroforez güç kaynağı



Resim 3.16. Benchtop 2UV™ Transilluminator LM-20 görüntüleme cihazı





Resim 3.17. Antioksidan aktivite analizi için Sigma 3-30K / 3-30KH çok amaçlı soğutmalı santrifüj ve Eppendorf 5452 Minispin Centrifuge



Resim 3.18. Bitki ekstraktlarını hazırlamak için Heating Mantle MS-E mantolu ısıtıcı, Rotary Evaporatör ve Cooling System Status soğutma sistemi

Hazırlanan ekstraktların saklanması için ise Arçelik A<sup>+</sup> +4°C buzdolabı kullanılmıştır. Fenolik bileşenlerin HPLC-DAD analizi Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüştür. Cihazın Markası: Shimadzu, Cihazın Modeli: Prominence Modular LC20A HPLC kullanılmıştır.

### 3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

#### 3.3.1. Antioksidan yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

##### 2,6 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi

0,0021 g potasyum persülfat tartılarak bir miktar metanolde çözüldü ve balon jode son hacim metanol ile 1000 mL'ye tamamlandı.

##### 200 mM pH'sı 6,6 fosfat tamponu

34,84 g  $K_2HPO_4$  hassas terazide tartıldıktan sonra 900 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak pH 6,6'ya ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

%1'lik Potasyum ferrosiyonad çözeltisi

1 gr  $K_3[Fe(CN)_6]$  tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve balon jojede son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik  $FeCl_3$  çözeltisi

0,1 gr  $FeCl_3$  tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve balon jojede son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%10'luk Trikloroasetik asit çözeltisi

10 gr TCA tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve balon jojede son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2 mM  $FeCl_2$  çözeltisi

0,0199 g  $FeCl_2$  tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve balon jojede son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5 mM ferrozin çözeltisi

0,0246 g tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve balon jojede son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.2. Antimikrobiyal yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Nutrient broth

1000 mL saf suda 8 gr olacak şekilde hazırlandı.

### 3.3.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılacak çözeltiler ve hazırlanması

Tris- borat (TBE) tamponu (pH 8,0)

54 g Trizma-base, 27,5 g borik asit ve 20 mL 0,5M EDTA (pH 8,0) bir miktar suda çözüldü son hacim su ile 1 lt'ye tamamlandı.

Etidyum bromür çözeltisi

1 L'de 10 mg olacak şekilde hazırlandı.

### 3.4. Bitki Materyallerinin Toplanması, Kurutulması ve Ekstraksiyona Hazır Hale Getirilmesi

*L. aestivum*'un materyalleri Mayıs 2014 döneminde çiçeklenme sırasında habitatlarından toplanmıştır. Toplanan bitki örneklerinin yerleri aşağıda listelenmiştir.

\* A6 Samsun-incesu çayır alanları, 30 metrede, 15 Mayıs 2014, Kandemir, 670.

\* A6 Samsun-çakırlar korusu, 20 metrede, 15 Mayıs 2014, Kandemir, 671.

Türlerin taksonomik tanımı Davis'e (1984) göre yapılmıştır. Bitki kısımları karanlık ve serin bir yerde kurutulmuştur. Bitki örneklerinin toprakaltı (soğan ve kök) ve topraküstü kısımları (bitki gövdesi, yaprak, çiçek, meyve ve tohum) temizlenerek oda sıcaklığında, gölgede bençlerde kurutulmuştur. Kurutulan bitki örnekleri öğütülene kadar bez torbalarda saklanmıştır. Daha sonra, kurutulmuş numuneler, 2 mm elek ve 500 rpm hız ile değirmende öğütülmüştür.

### 3.5. Bitkide Ekstraksiyon İşlemi

Ekstraksiyon işlemi için sırasıyla hekzan, etanol ve metanol çözücü olarak kullanılmıştır.

#### 3.5.1. Hekzan ile ekstraksiyon

2000 mL'lik balonun 2/3'si yani yaklaşık 1300 mL'si dolacak şekilde çözücü olarak kullanılan hekzan ile doldurulmuş ve balonun etrafında çözücü kalmaması için etrafi kurulanıp mantolu ısıtıcıya yerleştirildi. Çalışılacak bitki kısmı 75 gr tartılarak ekstraksiyon için kartuş kağıdına yerleştirildi. Daha sonra kartuş kağıdı sokslet düzeneğinin içine yerleştirildi. Mantolu ısıtıcı 100 °C'ye ayarlanarak 8-9 saat süresince ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra kullanılan bu bitki örneği bir sonraki ekstraksiyon işleminde kullanılabilir hale getirmek için, kartuş kağıdından alındı ve içindeki hekzan çözücüsü kalıntısından tamamen arındırılması amacıyla bekletildi. Elde edilen hekzan solventi evaporatörde 100 rpm'de 64 °C'de evaporasyon işlemine tabi tutuldu ve elde edilen hekzan ekstraktı küçük şeffaf şişelerde deneylerde kullanılmak üzere biriktirilerek saklandı.

### 3.5.2. Etanol ile ekstraksiyon

İlk olarak hegzandan geçirilen bitki örneği ekstraksiyon için kartuş kağıdına konularak sokslet düzeneğine yerleştirildi. Mantolu ısıtıcıya 1300 ml etanol çözeltisi ilave edildi ve yaklaşık 150 °C'ye ayarlanarak 8-9 saat süresince ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bitki örneğini bir sonraki ekstraksiyon işleminde kullanılabilir hale getirmek amacıyla kartuş kağıdından alınıp içindeki etanol çözücüsü kalıntısından tamamen arındırmak üzere bekletildi. Elde edilen etanol solventi evaporatörde 100 rpm'de 68 °C'de evaporasyon işlemine tabi tutuldu ve elde edilen etanol ekstraktı küçük şeffaf şişelerde deney aşamasında kullanılmak üzere biriktirilerek saklandı.

### 3.5.3. Metanol ile ekstraksiyon

Etanolden geçirilen bitki örneği, ekstraksiyon için kartuş kağıdına konularak sokslet düzeneğine yerleştirildi. Mantolu ısıtıcıya 1300 ml metanol çözeltisi ilave edilip yaklaşık 150 °C'ye ayarlandı ve 5-6 saat süresince ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen metanol solventi evaporatörde 100 rpm'de 70 °C'de evaporasyon işlemine tabi tutuldu ve elde edilen metanol ekstraktı da küçük şeffaf şişelerde deney aşamasında kullanılmak üzere biriktirilerek saklandı.

## 3.6. Ekstraktın Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması

Serbest radikaller ile kanser, artrit, ateroskleroz, alzheimer hastalığı ve diyabet dahil birçok hastalığın patogenezi arasındaki ilişki, oksidatif hasarı teşvik ettiği için geniş çapta araştırılmıştır. Fitokimyasalların sekonder metabolitinin antioksidan etkisi flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler gibi fenolik bileşikler nedeniyle oldukça önemlidir. Bitki ekstraktının antioksidan aktivitesini incelemek amacıyla DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) yöntemi, demir (Fe<sub>3</sub>) indirgeme metodu, metal şelatlama metodu, toplam fenolik madde miktarı hesaplama, toplam flavanoid miktarı belirleme gibi metodlar uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, kontrol olarak kullanılan butillenmiş hidroksianisol'un, askorbik asit'in ve resorcinol'un antioksidan etkileri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktların total fenol miktarları belirlenmiş ve değişik dalga boylarında HPLC cihazı yardımıyla analizleri yapılarak pik alanları tespit edilmiştir.

### 3.6.1. DPPH radikali yakalama aktivitesi

Serbest radikal süpürücü aktivite, Brand-Williams ve arkadaşlarının 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (1995). Standart olarak (Butillenmiş Hidroksianisol, Askorbik Asit ve Resorcinol) kullanıldı. Bitki materyallerinin farklı konsantrasyonları hazırlanarak, 0.75 mL olan bu ekstraktlar metanolde 20mg/L DPPH solüsyonunun, 1.5 mL'si içine eklendi ve bu solüsyona (100-500µg/ mL) butillenmiş hidroksianisol, askorbik asit ve resorcinol eklendi. Karışımın absorbansı 517 nm' de oda sıcaklığında ve 30 dakika karanlık ortamda bekletilerek ölçüldü.

DPPH radikal süpürücü aktivite (yüzde inhibisyon) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[ \frac{AK - AÖ}{AK} \right] \times 100$$

AK: Kontrolün absorbansı

AÖ: Örneğin absorbansı

Daha sonra farklı derişimlerle ölçülen absorbanslarla grafik çizildi.  $y = ax + b$  denkleminde DPPH derişimini yarıya düşüren örnek miktarı µg/mL cinsinden bulunarak IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

### 3.6.2. Demir indirgeme aktivitesi

*L. aestivum* ekstraktlarının radikal azaltma aktivitesi ölçümleri Oyaizu yöntemine göre yapılmıştır (1986). *L. aestivum* ekstraktlarının demir indirgeme aktivitesi tayini için 15 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. 0, 40, 60, 80, 120, 200, 400, 600, 800, 1000 µl stok solüsyondan alınarak üzerine sırasıyla 2500, 2460, 2440, 2420, 2380, 2300, 2100, 1900, 1700, 1500 çözücüsünden ilave edilerek son hacim 2,5 ml'ye tamamlandı. Her birinin üzerine 200 mM 2,5 mL, fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL potasyum ferriksiyaniid K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%,W/v) eklendi. Sonra karışım daha önceden 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüpler su banyosundan alındı ve üzerlerine 2.5 mL triklorasetikasid (TCA) çözeltisinden (10%,W/v) 2.5 mL eklenerek 10 dk boyunca 3000 rpm'de santrifüj edildi. Bu karışımdan 2.5 mL bir tüpe eklenerek üzerlerine 2.5 mL distile su ilave edildi. En son olarak da 1 mL (1%,w/v), 0.5 mL FeCl<sub>3</sub> çözeltisinden eklendi. Reaksiyon ortamının 700 nm'de çözücüden oluşan köre karşı absorbansı ölçüldü. Standart antioksidan olarak BHA ve askorbik asit kullanıldı.

### 3.6.3. Metal şelatlama aktivitesi

Ferröz iyonlar ( $Fe^{2+}$ ) üzerinde ekstraktının şelatlama aktivitesi Decker ve Welch yöntemine göre ölçüldü (1990). Bu işlem için ilk önce 50 µl, 2 mM  $FeCl_2$  çözeltisi farklı derişimlerde (100, 200, 300, 400 ve 500 µg/ mL )hazırlanan 1 ml ekstraktlar üzerine eklendi ve 3,7 mL distile su ile karıştırıldı. Karışım 30 dakika boyunca  $FeCl_2$  (2 Mm,0.1mL) ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon oda sıcaklığında 10 dakika (0,2 mL, 5 mM) ferrozin solüsyonu eklenerek 562 nm'de absorbansı ölçüldü. Çözelti vortekste kuvvetlice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Ekstraktların şelatlama aktivitesi aynı konsantrasyonlardaki EDTA ile karşılaştırıldı.

Metal şelatlama aktivitesi % inhibisyon =  $[ AK - AÖ / AK ] \times 100$

AK: Kontrolün absorbansı

AÖ: Örneğin absorbansı

### 3.6.4. Total flavonoid aktivitesi

Toplam flavonoid içeriği, Park ve ark. yöntemi kullanılarak kersetin standart çözeltisi ile belirlenmiştir (2008). Bitki ekstraktları konsantrasyonu elde etmek üzere metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlandı. 0.3 mL bitki ekstraktı üzerine %30'luk 3,4 mL metanol eklendi. Daha sonra 0,15ml %5'lik  $NaNO_2$  ve 0,3 M  $AlCl_3.H_2O$  ilave edildi. Oda sıcaklığında 6 dk inkübe edildikten sonra 1M 1mL NaOH ilave edilerek karıştırılarak 506 nm'de absorbansı ölçüldü. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrisi standart olarak kersetin kullanılarak standartın ve ekstraktın total flavonoid içeriği kersetin eşdeğeri olarak ifade edildi.

### 3.6.5. Total fenolik aktivitesi

Slinkard ve Singleton tarafından bildirilen yöntemle Folin-Ciocalteu reaktifi, gallik asite bağlı olarak toplam fenolik içeriği belirlemek için kullanıldı (1977). Bitki ekstraktları 500 µg/mL konsantrasyonu elde etmek üzere metanolde çözüldü. 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ekstraktın 1 mL'sine ilave edildi ve 5 dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. 2 mL sodyum karbonat (%2'lik) ilave edilerek karanlıkta 1 saat bekletildikten sonra 765 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi standart olarak gallik asit'in (100-500 µg/mL) konsantrasyonları kullanılarak standartın ve ekstraktın total fenolik madde içeriği gallik asit eşdeğeri olarak ifade edildi.

### 3.7. Ekstraktın Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması

Antimikrobiyal aktiviteler minimal inhibitör konsantrasyon kullanılarak (MİK) standart bakteriyel Gram-pozitif bakteri suşlarına (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 7064) ve Gram-negatif bakterilere (*Escherichia coli* W3110, *Salmonella typhimurium* LT2) ve bir mayaya (*Candida albicans* ATCC 10231) karşı test edilmiştir. Ekstraktlar uygun bir konsantrasyonda DMSO içerisinde çözdürüldü. Broth seyreltme yöntemi için kültürler, 175 rpm'de su banyosunda çalkalanarak 18 saat 37°C de 5 mL nutrient broth (Merck) içinde yetiştirildi. Daha sonra bakteri ve maya hücreleri 0.5 McFarland bulanıklık standartları ile eşleştirilerek, yaklaşık  $10^6$  hücre/ml'lik bir konsantrasyonda 50 mL nutrient broth ile suspanse edildi. Mikroorganizmaları içeren nutrient broth (1 mL) test tüplerine aktarıldı ve komplekslerin ilave edilmesinden sonra iki kat seri seyreltme yapıldı. Bütün test kültürleri 24 saat 37 °C de büyütülmüştür. Büyüme gözlenmeyen minimum inhibitör konsantrasyon, MİK değeri ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) olarak alındı ve en az üç kez tekrarlandı. Ekstraktların tamamı ve çözücüler de antimikrobiyal aktivite için test edildi (CLSI, 2019).

### 3.8. Ekstraktın Plazmid DNA Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Agaroz jel elektroforezindeki deneyler için 0.25mg/ mL super sarmal Pbr322 DNA suşu kullanılarak, bitki ekstraktının 10 mg/ mL'si ve 1'in 0.75  $\mu\text{g}$ 'ı DMSO da çözüldü. 37 °C de 2 saat inkübasyondan sonra 0.5  $\mu\text{L}$  (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol suda) içeren yükleme tamponu herbir tüpe eklendi ve bu solüsyona %0,8 agaroz jel eklendi. 80 dakika 80 V'da TBE buffer (89 mM Tris-borate, Ph8.3, 2.5 M medta) içeren buffer'a yüklendi. Ethidium bromide (1 mg/mL) ile 15 dakika boyanması için bekletildikten sonra UV ışığı altında fotoğrafları çekildi (Dixit ve diğerleri, 2011).

### 3.9. TLC (İnce tabaka kromatografisi) Uygulama

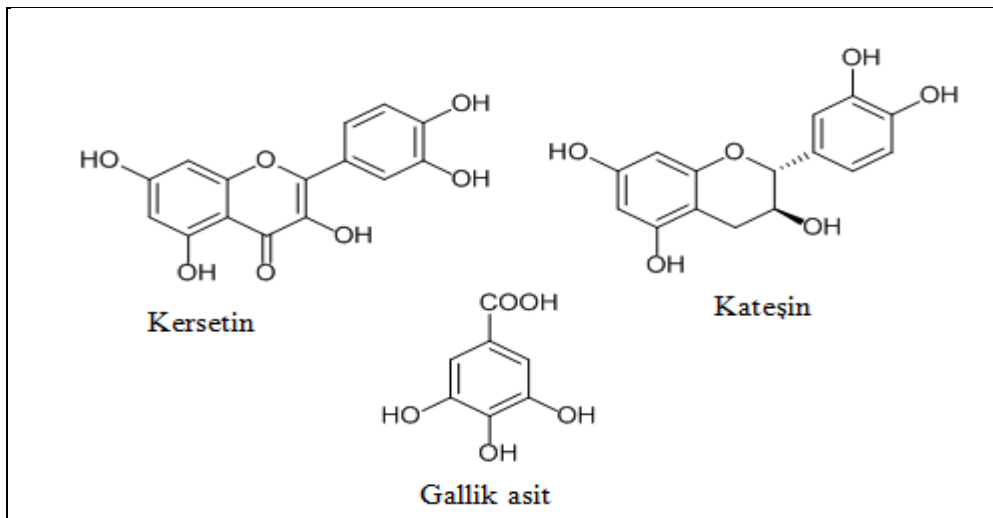
Fonksiyonel grupları görmek için bir miktar *L. aestivum* türüne ait bitki ekstraktı etil asetat ile çözüldü. TLC-Thin Layer Chromatografi kâğıdı alındı (TLC silika jel 60). Üzerine uygulanacak madde kadar nokta belirlendi ve çözülmüş olan numuneler o noktalara tatbik edildi. *L. aestivum* toprakaltı ve topraküstüne ait olmak üzere 2 ekstrakt alındı ve etil asetat ile çözüldü. Sabit ve hareketli faz olmak üzere iki fazımızdan sabit fazı TLC kartı (silika

jel 60) ile hazırlandı, hareketli fazı ise iki farklı şekilde hazırlandı. Bunlar: 2 hekzan, 1 etil asetat karışımından (yaklaşık 5 ml kadar) ve 1 hekzan, 1 etil asetat, 1 metanol karışımından (toplam 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır) oluşmaktadır. Daha sonra burada yürümesi izlendi (Tswett, 1906).

### 3.10. HPLC Analizleri

*L. aestivum*'a ait homojenize edilmiş topraküstü ve toprakaltı materyali ayrı ayrı metanol ve etanol polar protik solventler seçilerek ekstrakte edildi. *L. aestivum* 'un in vitro kültürlerinde HPLC Diop ve ark. yöntemine göre hazırlanan ekstraktlar analiz yapılarına kadar +4°C buzdolabında ışık almayacak şekilde kaplanarak saklanmıştır (2006). Analiz öncesi toplam 4 ekstrakt (toprakaltı MeOH ve EtOH ve topraküstü MeOH, EtOH) 1 mg/1mL şeklinde solventlerindeki çözeltileri hazırlanmıştır. Ekstraksiyon aşamasında elde edilen bitki ekstraktları 0.45 µm'lik membran filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmış ve yüksek performanslı likid kromatografisine (HPLC) enjekte edilmiştir (100 µL).

Çalışmamızda standart olarak gallik asit, kersetin ve kateşin flavonoid ve fenolik bileşenlerini kullandık. HPLC ile fenolik madde tayininde kullanılan gallik asit, (+)-kateşin ve kersetin standartları Sigma-Aldrich Co. LLC firmasından temin edilmiştir. Öncelikle standartlar tek tek verilerek metod çalışması yapılmıştır.



Şekil 3.1.Standart flavonoid türevlerini kullanarak HPLC

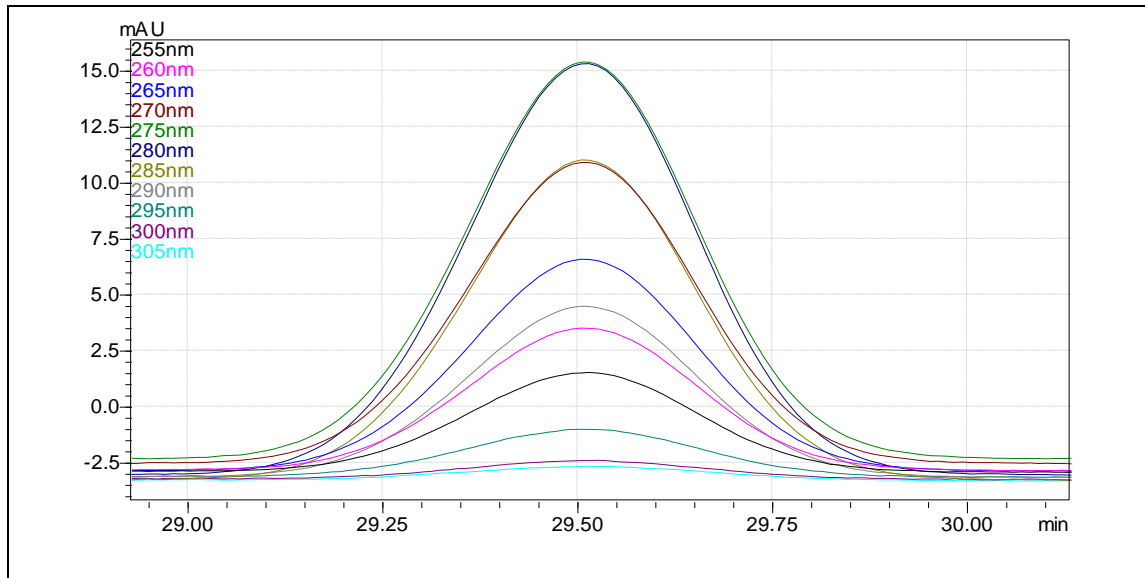


Çalışmamız da belirlenen standartlar ile ters faz-HPLC çalışmasını diyot array dedektör (DAD) ile 280 nm de gerçekleştirdik. 280 nm dışında diğer dalga boyların da çalışma yapıldı, optimize koşullar oluşturuldu. Kolon olarak 250 x 4,6 mm i.d., 5µm kolon olan C18 türü kolon seçildi. Akış hızı 1 ml/dak., 30 µl örnek analize gönderilerek, kolon sıcaklığı 27 °C olarak ayarlandı. Gradient çalışması seçildi ve iki farklı hareketli faz kullanıldı. A hattı formik asit-su (0,1%), B hattı metanol (Tablo 3.1)

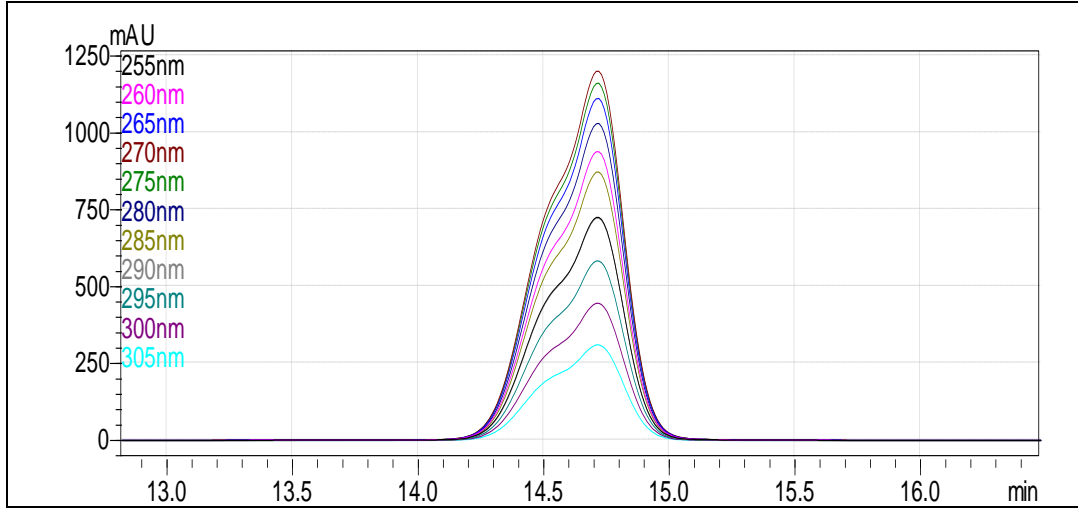
Çizelge 3.1. Solvent Programlama

Süre	%A	%B
0	100	0
3	95	5
18	80	20
30	75	25
35	70	30
40	60	40
55	50	50
60	40	60
75	100	0

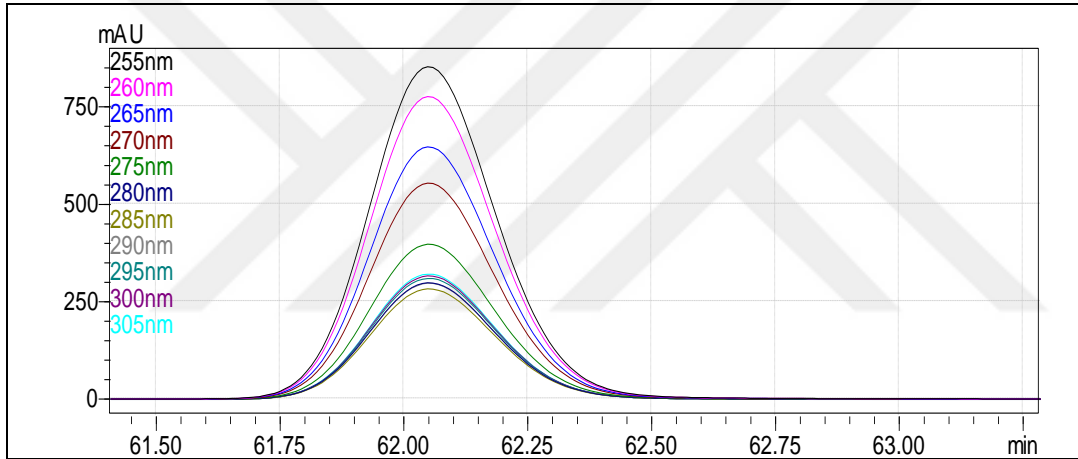
Çalışmamızda dalga boyu belirlerken her standart için 305-255 nm arasında çalışmalar yapılmıştır. Şekillerde de görüleceği gibi 280 nm optimize şart olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Kateşin dalga boyu



Şekil 3.3. Gallik asit dalga boyu



Şekil 3.4. Kersetin dalga boyu

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

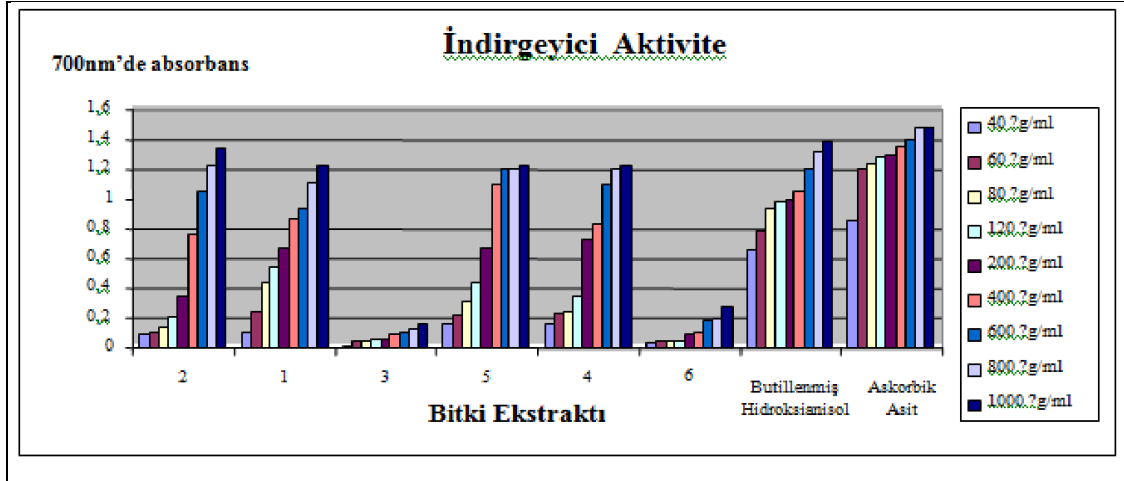
### 4.1. *Leucojum aestivum* Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerine Ait Bulgular

Hava ile kurutulmuş *L. aestivum* toprakaltı ve topraküstü kısımları metanol, etanol ve hekzan çözücülerini kullanılarak iki defa kaynama noktasında sokslet aparatı ile ekstrakte edildi. Organik çözücüler buharlaştırıldı ve kalan tortu, başka antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler için çözüldürülerek HPLC ile analiz edildi. Toprakaltı metanol (1), etanol (2), hekzan (3); topraküstü metanol (4), etanol (5), hekzan (6) olmak üzere 6 ekstrakt elde edildi.

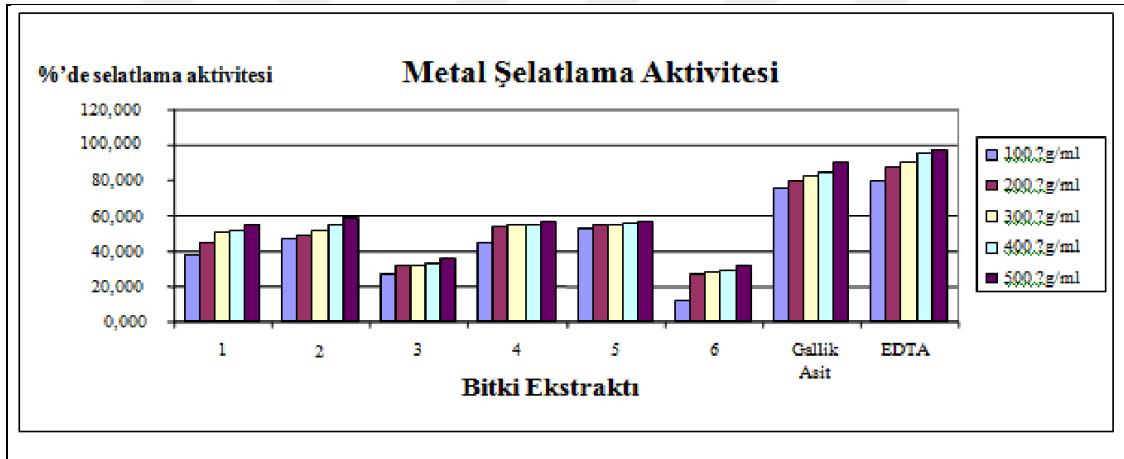
*L. aestivum* ekstraktlarının antioksidan özellikleri ile ilgili olarak elde edilen bulgular aşağıda ifade edilmiştir:

#### 4.1.1. *Leucojum aestivum* ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi

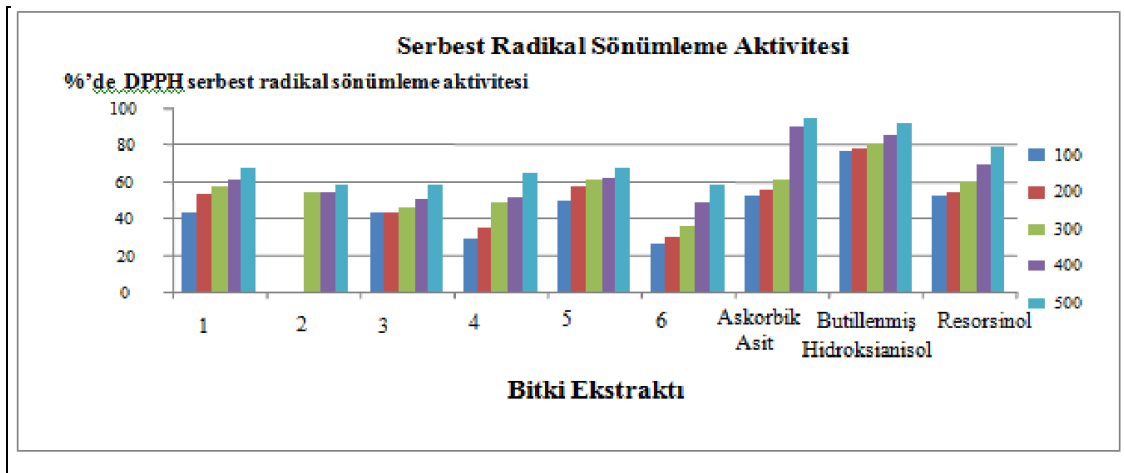
Farklı konsantrasyonlarda *L. aestivum* ekstraktları hazırlayarak yapmış olduğumuz çalışmada *L.aestivum* ekstraktlarının oldukça yüksek serbest radikal süpürme aktivitesi gösterdiğini gözlemledik. Altı ekstraktın sonuçları Şekil 4.3 'te görülmektedir. Butillenmiş hidroksianisol, Askorbik asit ve Resorsinol standartları kullanarak gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada Butillenmiş Hidroksianisol, Askorbik asit ve Resorcinol'un radikal süpürme aktivitelerinin *L. aestivum* ekstraktlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 5 numaralı topraküstü etanol bitki ekstraktının, bitkinin diğer ekstrelerinden daha kuvvetli serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *L. aestivum*'un 3 ve 6 numaralı toprakaltı ve topraküstü hekzan ekstraktlarının orta düzeyde radikal süpürme aktivitesi gösterdiği görülmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz DPPH sonuçları *L. aestivum*'un 5 numaralı topraküstü etanol bitki ekstraktının diğer bitki ekstraktlarına göre daha iyi IC50 değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Serbest radikal DPPH'ı % 50 azaltmak için gereken antioksidan konsantrasyonu olan [IC] 50 değerleri, 1, 2,3,4,5,6 için sırasıyla 317, 169, 167, 345, 144 ve 442 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. *L. aestivum* ekstraktlarının ve standartlarının antioksidan aktivitesi yoluyla tayini (a) İndirgeyici Aktivite



Şekil 4.2. *L. aestivum* ekstraktlarının ve standartlarının antioksidan aktivitesi yoluyla tayini (b)Metal Şelatlama Aktivitesi.



Şekil 4.3. *L. aestivum* ekstraktlarının ve standartlarının antioksidan aktivitesi yoluyla tayini (c) DPPH Radikal Sönümlenme.

Tüm numunelerin toprakaltı metanol (1), toprakaltı etanol (2), toprakaltı hekzan (3) ve topraküstü metanol (4), topraküstü etanol (5), topraküstü hekzan (6) ekstraktlarının radikal indirgeyici aktivitesi analizleri ise Şekil 4.1 'de görülmektedir. İndirgeyici aktivitesi en yüksek olan bitki ekstraktı, 2 numaralı toprakaltı etanol ekstraktı iken, 1 numaralı toprakaltı metanol ekstraktı onu takip etmektedir. Daha sonra ise 5 numaralı ekstrakt olan topraküstü etanol gelmekte ve onu 4 numaralı bitki ekstraktı olan topraküstü metanol ekstraktı takip etmektedir. 3 ve 6 numaralı toprakaltı ve topraküstü hekzan ekstraktlarının ise indirgeyici aktivitesinin oldukça az olduğu görülmektedir. Metal şelatlama aktivitesi bakımından Şekil 4. 2' de ekstraktlardan sırasıyla 1,2,4 ve 5 numaralı ekstraktlar olan toprakaltı metanol, toprakaltı etanol, topraküstü metanol ve topraküstü etanol ekstraktlarının en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, 3 ve 6 numaralı her iki hekzan ekstresi (toprakaltı ve topraküstü) orta derecede aktivite göstermiştir. EDTA ve gallik asit pozitif standart olarak kullanılmıştır. Ekstraktların metal şelatlama aktivitesinin belirlenmesinin konsantrasyonuna bağlı olarak tüm ekstraktların en yüksek konsantrasyonlarının en yüksek radikal azaltma potansiyeli sergilediği görülmüştür.

#### **4.1.2. *Leucosium aestivum* ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid bileşiklerinin belirlenmesi**

Bitki ekstraksiyon metodolojisi genellikle terpenler, terpenoidler ve küçük alkaloidlerin ayrılması için hekzanı kullanır. Fenolik ve flavonoid içeriği seçtiğimizde, polar ve protik çözücü sistemi kullanmamız gerekir. Folin yönteminin sonuçları bu bilgiyi desteklemektedir. Toplam fenolik içeriğin en yüksek değeri 5 numaralı topraküstü etanol ekstraktı iken, 1 numaralı toprakaltı metanol ekstraktı onu takip etmektediriçeriğine sahiptir. Toplam flavonoid içeriğin en yüksek değeri 1 numaralı toprakaltı metanol ekstraktı iken 2 numaralı toprakaltı etanol ise onu takip etmektedir.

Çizelge 4.1. Çeşitli *L. aestivum* ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri

Ekstrakt Tipi	Total Fenolikler (Gallik asit (mg)/g) <sup>1</sup>	Total Flavonoid (Kersetin (mg)/g) <sup>2</sup>
1	58,92	85
2	48,92	71,6
3	12,50	18,33
4	53,93	68,33
5	59,64	TE <sup>1</sup>
6	18,2	55

TE<sup>1</sup>: Tespit Edilemedi

#### 4.2. *Leucojum aestivum* Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerine Ait Bulgular

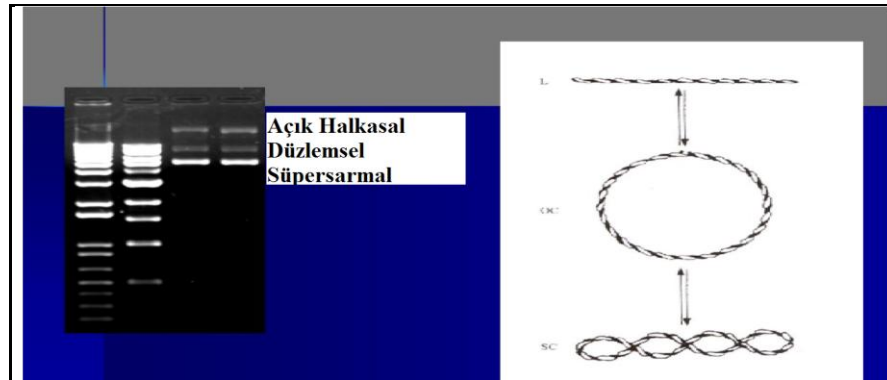
*L. aestivum* ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Buna göre Gram negatif bakteri olan *Escherichia coli* üzerinde toprakaltı etanol, topraküstü metanol ve topraküstü hekzan ekstraktları anlamlı aktivite gösterirken, toprakaltı metanol, toprakaltı hekzan ve topraküstü metanol ekstraktları *Escherichia coli* üzerinde iyi aktivite gösterememiştir. Bir başka Gram negatif bakteri olan *Salmonella typhimurium* üzerinde toprakaltı metanol, toprakaltı etanol ve topraküstü etanol ekstraktları oldukça iyi aktivite gösterirken toprakaltı hekzan, topraküstü metanol ve topraküstü hekzan ekstraktları iyi aktivite gösterememiştir. Gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* üzerinde toprakaltı metanol, toprakaltı etanol, toprakaltı hekzan, topraküstü metanol, topraküstü etanol ve topraküstü hekzan ekstraktlarından hiçbiri iyi aktivite gösterememiştir. Toprakaltı metanol, toprakaltı etanol, toprakaltı hekzan, topraküstü metanol ve topraküstü etanol ekstraktları *Bacillus cereus* üzerinde iyi aktive göstermiştir. Ancak 6 numaralı topraküstü hekzan ekstraktı *Bacillus cereus* üzerinde iyi aktive gösterememiştir. Maya mantarı olan *Candida albicans* üzerinde toprakaltı metanol ekstraktı hariç toprakaltı etanol, toprakaltı hekzan, topraküstü metanol, topraküstü etanol ve topraküstü hekzan ekstraktları oldukça iyi aktivite göstermiştir. Tüm bu MİK çalışmasının sonuçlarına göre en hassas ekstrakt, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* dahil olmak üzere 3 bakteri ve 1 maya mantarına karşı etkili 2 numaralı toprakaltı etanol ekstraktı olmuştur. Tüm MİK çalışması verilere göre bitki ekstraktlarının toprakaltı kısımlarının genellikle topraküstü kısımdan daha reaktif olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Çeşitli Mikroorganizmalara Karşı Ekstraktların Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ).

MİK değerleri/ $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	2	3	4	5	6	DMSO
<i>Escherichia coli</i> W3110	1000	250	2000	1000	250	250	4000
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2	250	250	1000	250	1000	1000	4000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC2 5923	1000	1000	1000	1000	1000	1000	4000
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	250	250	250	250	250	2000	4000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	250	250	250	250	250	4000

### 4.3. *Leucojum aestivum* Ekstraktlarının Plazmid DNA Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Bir çift silindirik heliksi andıran DNA molekülü çoğunlukla Resim 4.1’ de görüldüğü gibi ya düzlemsel (lineer), gevşek kapalı dairesel veya süpersarmal adını vereceğimiz üç formda bulunurlar ( Yılmaz, Pirinççi ve Erdoğan, 2005). Stabil bir molekül olan DNA da karbohidratlar, lipidler ve proteinler gibi kimyasal oksidatif hasara uğramakta ve oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmaktadır. Hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olmaktadır. Ayrıca DNA hasarının çeşitli hastalıkların etyolojisinde ve yaşlanmada önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Plazmid DNA süper kıvrımlı DNA’nın (Form I) lineer DNA (Form III) ve/veya tırtıklı DNA’ya (Form II) şeklinde 3 yapı göstermektedir (Ozmen, Çelikoğlu ve Yazıcı, 2011).



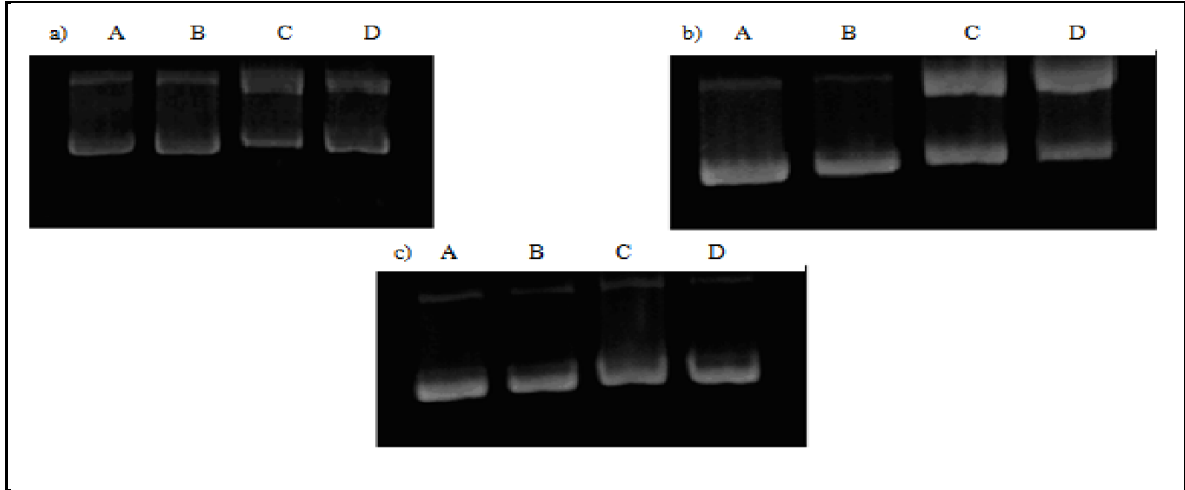
Resim 4.1. Plazmid DNA formları

*Leucojum aestivum* ekstraktlarının DNA etkileşimi sonuçları Şekil 4.4'de sunulmuştur. Şekil 4.4 (a) toprakaltı ve topraküstü metanol ekstraktı sonucunu göstermektedir. 4 kuyucuktan ilki olan A kuyucuğunda pozitif kontrol olarak su, kuyucuğunda negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır ve pBR322 plazmid DNA'nın herhangi bir etkileşimi pozitif kontrol olarak kabul edilir. C kuyucuğunda 4 numaralı bitki ekstraktı olan topraküstü metanol ekstraktı yer alırken, D kuyucuğunda 1 numaralı bitki ekstraktı olan toprakaltı metanol ekstraktı bulunmaktadır. Buna göre C ve D kuyucuğunun toprakaltı ve topraküstü bitki ekstraktlarının her ikisinde de bantlaşma olmasına rağmen, 4 numaralı topraküstü metanol ekstraktının daha fazla etkileşime sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 4.4 (b) toprakaltı ve topraküstü etanol ekstraktı sonucunu göstermektedir. 4 kuyucuktan ilki olan A kuyucuğunda pozitif kontrol olarak su, B kuyucuğunda negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır ve pBR322 plazmid DNA'nın herhangi bir etkileşimi pozitif kontrol olarak kabul edilir. C kuyucuğunda 5 numaralı bitki ekstraktı olan topraküstü etanol ekstraktı yer alırken, D kuyucuğunda 2 numaralı bitki ekstraktı olan toprakaltı etanol ekstraktı bulunmaktadır. Buna göre C ve D kuyucuğunun toprakaltı ve topraküstü bitki ekstraktlarının her ikisinde de bantlaşma olmasına rağmen, 2 numaralı toprakaltı etanol ekstraktının MİK çalışmasının sonuçlarına paralel olarak oldukça fazla etkileşimine sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 4.4 (c) toprakaltı ve topraküstü hekzan ekstraktı sonucunu göstermektedir. 4 kuyucuktan ilki olan A kuyucuğunda pozitif kontrol olarak su, B kuyucuğunda negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır ve pBR322 plazmid DNA'nın herhangi bir etkileşimi pozitif kontrol olarak kabul edilir. C kuyucuğunda 6 numaralı bitki ekstraktı olan topraküstü hekzan ekstraktı yer alırken, D kuyucuğunda 3 numaralı bitki ekstraktımız olan toprakaltı hekzan ekstraktı bulunmaktadır. Buna göre C ve D kuyucuğunun toprakaltı ve topraküstü hekzan bitki ekstraktlarının her ikisinde de bantlaşma olmadığından dolayı 3 ve 6 numaralı toprakaltı ve topraküstü hekzan ekstraktlarının iyi bir etkileşim göstermediği görülmektedir.



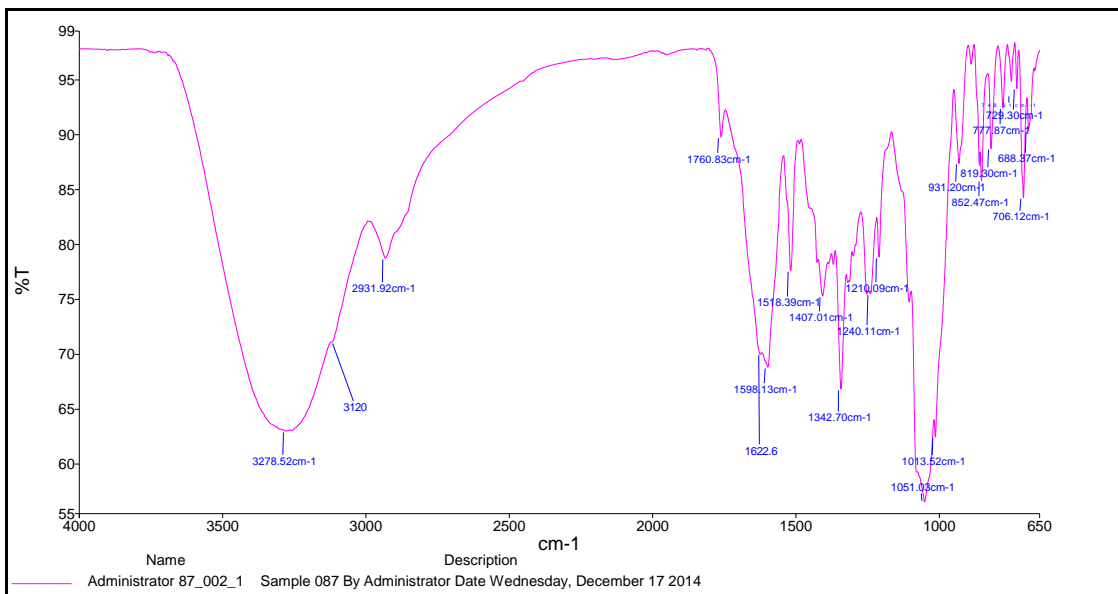


Şekil 4.4. pBR322 Plazmid DNA'nın etkileşime dayalı olarak Agaroz Jel Elektrofrezisi Sonuçları: a) Metanol ekstraktı; b) Etanol ekstraktı; c) Hekzan ekstraktı; A:Pozitif kontrol;B:Negatif kontrol; C:Topraküstü bitki ekstraktı; D:Toprakaltı bitki ekstraktı.

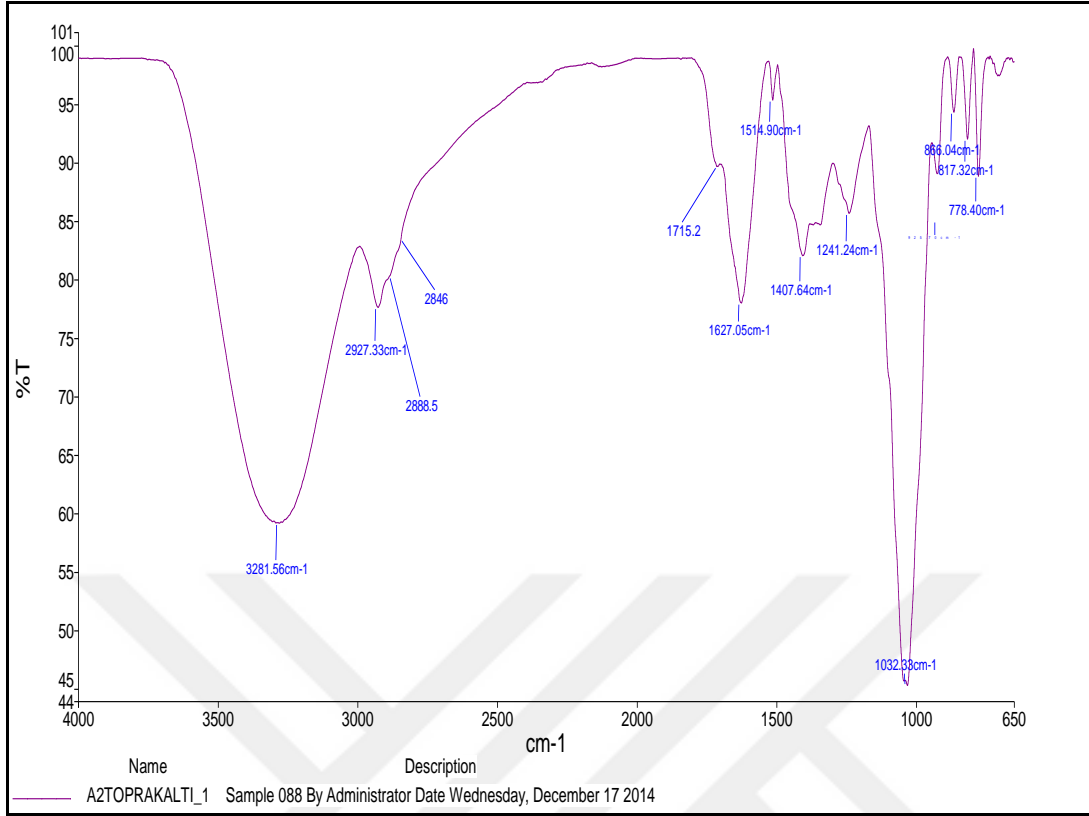
#### 4.4. *Leucojum aestivum* Ekstraklarının Kromatoğrafik Yöntemine Ait Bulgular

##### 4.4.1. FT-IR (infrared) spektrum metodu

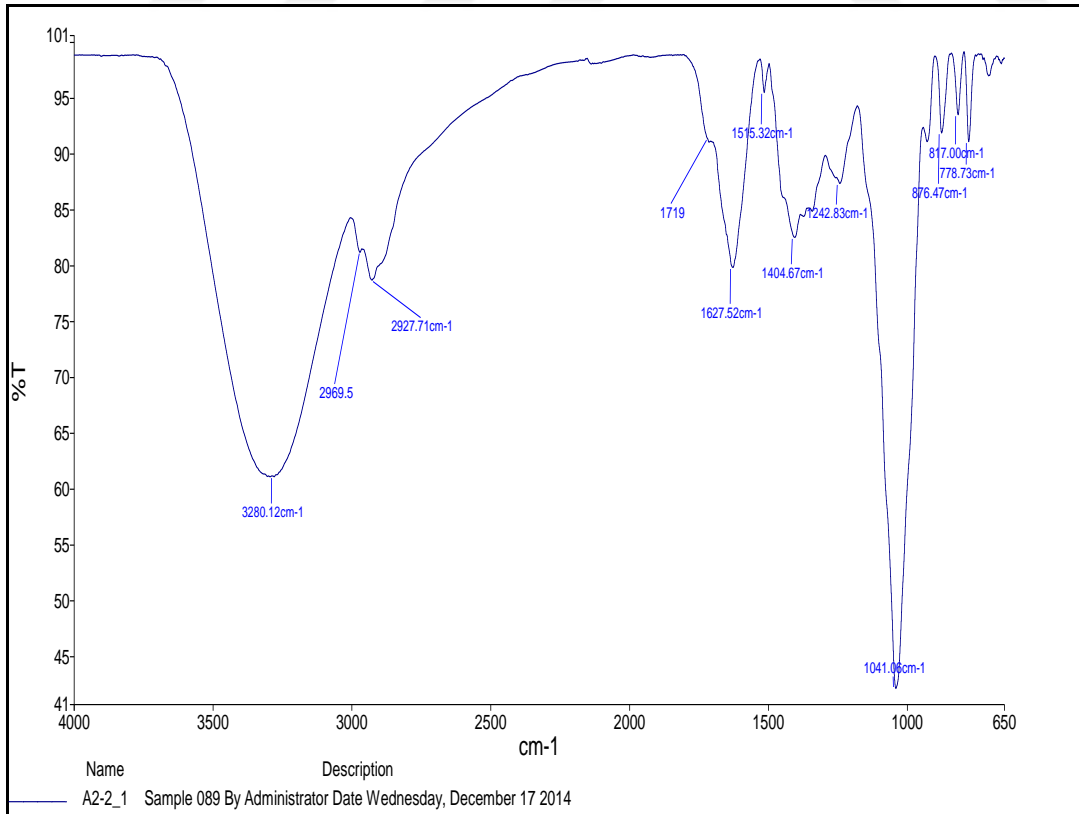
*L. aestivum*'a ait bitki ekstraktı örneklerinin molekülleri içindeki fonksiyonel yapıları görmek için gerçekleştirmiş olduğumuz FT-IR spektrum analizi sonucu Şekil (4.5), (4.6), (4.7)'de görülmektedir.



Şekil 4.5. *Leucojum aestivum* topraküstü metanol ekstraktına ait spektrum



Şekil 4.6. *Leucojum aestivum* toptrakaltı metanol ekstraktına ait spektrum



Şekil 4.7. *Leucojum aestivum* toptrakaltı metanol ekstraktına ait spektrum

Perkin Frontier cihazına *L. aestivum* topraküstü bitki ekstraktında FT-IR sonuçlarına göre örneklerimizi yerleştirdik ve görüntülerimizi yorumladık. Sonuç olarak *L. aestivum* topraküstü ekstraktı örneklerimizin yapılarında hidroksi grubunu belirledi. Pik yaygın olduğu için molekül içi hidrojen bağı olduğu düşünülmektedir. Hidroksi sinyal grubu piki aromatik bölgeye kadar yayılmaktadır. Bu durumda birden fazla hidroksi grubu içeren şeker (karbonhidrat) gibi yapılarla uyumludur. Alifatik ve aromatik bölgeler vardır.

*L. aestivum* toprakaltı ekstre örneklerinin FT-IR sonuçlarına göre *L. aestivum* topraküstü ekstraktlarına benzer özellikler gözlemlendi. Farklı olan ise 3100 bölgesinde sinyal grubu olmadığı kesin olmasıdır. Madde miktarı azaltılarak tekrar spektrum alınmıştır ve alınan spektrum sonucunda NH grubuna rastlanmamıştır.

#### 4.4.2. TLC (Thin Layer Chromatografi) uygulama

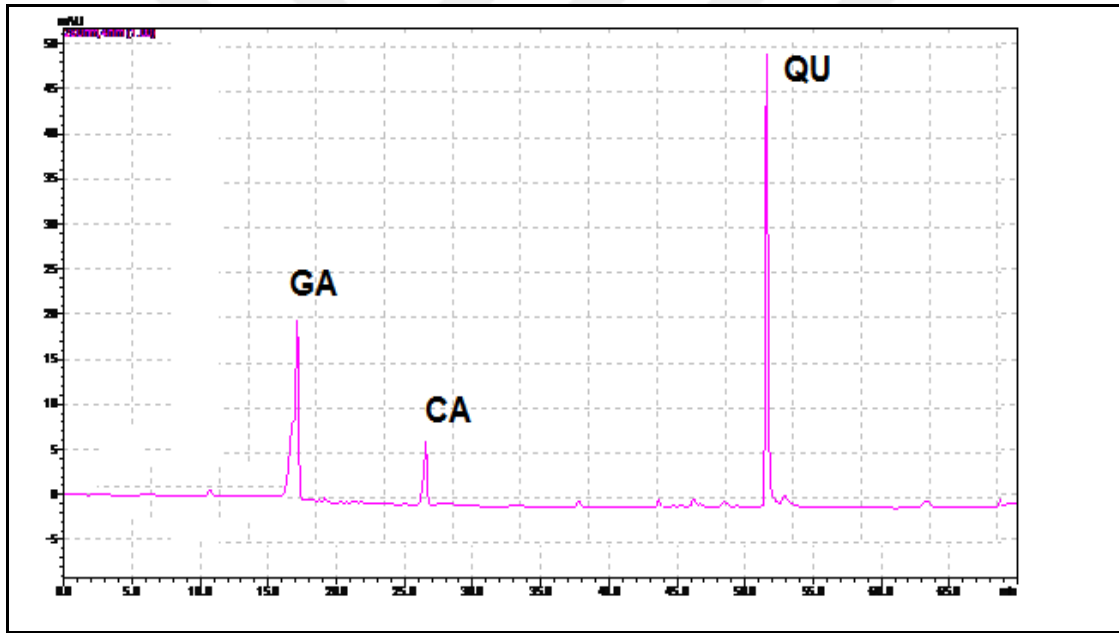
Fonksiyonel grupları görmek için 2 (*L. aestivum* toprakaltı ve topraküstü) ekstrakt alındı ve etil asetat ile çözüldü. Sabit ve hareketli faz olmak üzere iki fazımızdan sabit fazı TLC kartımız (silika jel 60) üzerine uygulanacak madde kadar nokta belirlendi ve bu çözülen numuneler o noktalara tatbik edildi. Hareketli faz ise iki farklı şekilde hazırlandı. Bunlar: 2 hekzan, 1 etil asetat karışımından (yaklaşık 5 ml kadar) ve 1 hekzan, 1 etil asetat, 1 metanol karışımından (toplam 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır) oluşmaktadır. Daha sonra burada yürümesini izledik.

254 ve 366 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda ekstrakt içinde bulunan maddeler gözlenmeye çalışıldı. 366 nm'de *L. aestivum* topraküstü ekstresinde floresan özellik gösteren bileşenlerin olduğu görüldü. İki farklı hareketli faz çalışması UV lambada bakıldığında hareketli faz olarak seçilen 2 hekzan, 1 etil asetat sisteminde bileşenlerin TLC kartında hareket etmediği gözlemlendi. Yine hareketli faz olarak 2 hekzan, 1 etil asetat ve 1 etanol kullanıldı (3. olarak). Diğer hareketli faz olan 1 hekzan, 1 etil asetat, 1 metanol karışımında hareket eden bileşikler görüldü. Aynı zamanda floresan bölge olan 366 nm'de sinyal yerleri tesbit edildi ve işaretlendi. İşaretlenen bölgelerin doymamışlık özelliğinin belirlenmesi için potasyum permanganat içeren boyama çözeltisi ile boyandı. 254 nm'de üste gözükten spotlar boyama çözeltisi ile sarı renkte boyandı bu ise molekülde aromatik ve doymamış grupları varlığını gösterdi. 2 hekzan, 1 etil asetat ve 2 etanol (4. hareketli fazımız) denendi. Bunun sonucunda 254 nm'de *L. aestivum* toprakaltı numunesinde diğer hareketli fazlarda gözlenmeyen polaritesi uygun bileşen tespit edildi.

*L. aestivum* topraküstü pH'ı : 6-7 arası, *L. aestivum* toprakaltı pH'ı : 7-8 arası'nda bulunmuştur. Bunun sonucunda yapılarda asitlik olmadığı gözlenmiştir. Denemeler sonucunda flavonoid özellik gösteren maddelerin TLC incelemeleri ile uyumluluk gösterdiği fakat spotların yoğunluğu ve boyama miktarları fazla olmadığı için flavonoid miktarın ekstre içerisindeki oranı düşük olduğu söylenebilir.

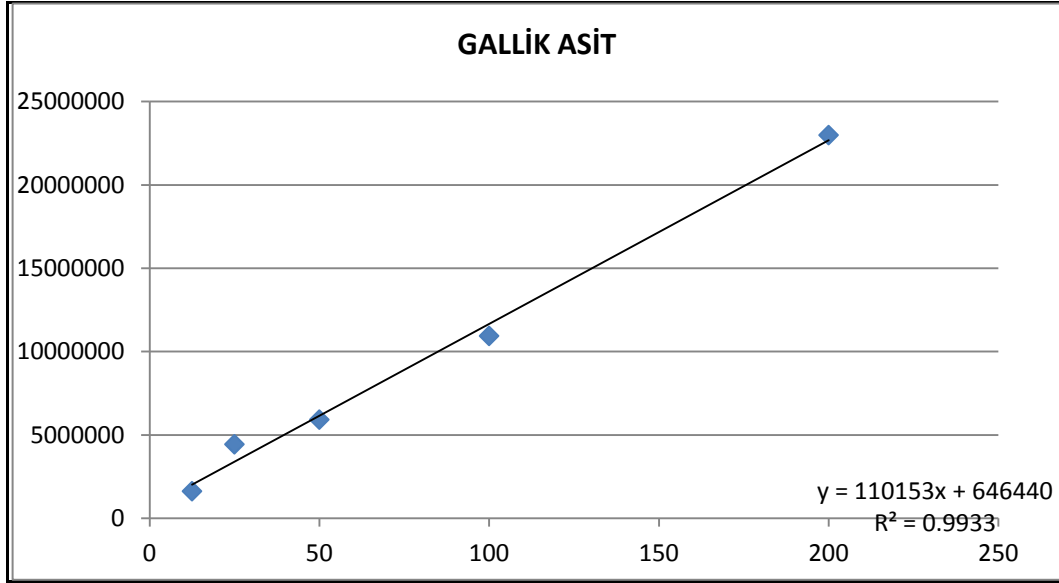
#### 4.5. HPLC Analizi

Karışım halinde hazırlanan standartların 280 nm de alınan kromatogramı ile alıkonma zamanları 15.79 dk olan gallik asitin, 35.21 dk olan kateşin, 53.35 dk olan kesretin şeklinde belirlenmiştir. Elde edilen bir kromatogram örneği Şekil 4.8'da görülmektedir.



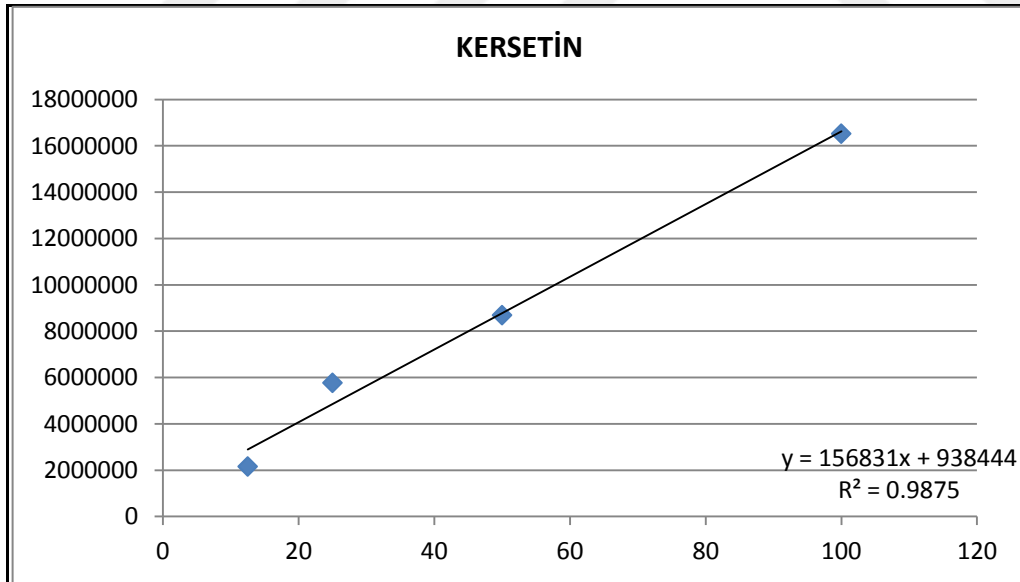
Şekil 4.8. Gallik asit (GA), kateşin (CA) ve kesretin (QU)'nin kromatogram görüntüsü

Her bir standart için 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ppm konsantrasyonda hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Pik alanları hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiklerin  $R^2$  değerleri belirlenmiştir. Doğruluk sınırı içerisinde elde edilen değerler olması nedeniyle kalibrasyon grafiği olarak kullanılmıştır. Şekil 4.9.'de gallik asitin kalibrasyon eğrisi görülmektedir.



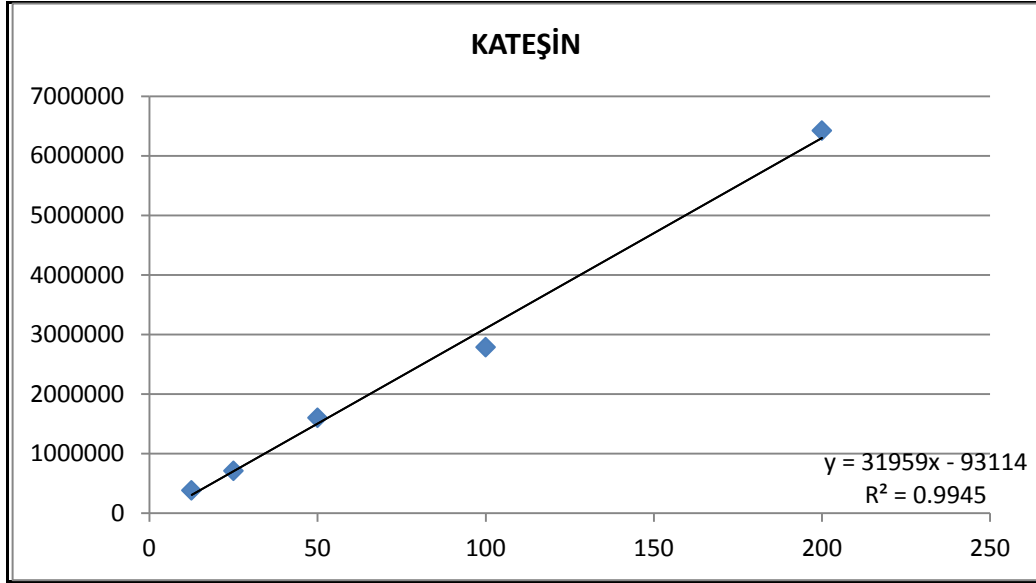
Şekil 4.9. Gallik asit'in kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 12.5, 25, 50, 100 ppm konsantrasyonda standartlar cihaza enjekte ederek pik alanları hesaplandı. Şekil 4.10'de kersetinin kalibrasyon eğrisi görülmektedir.



Şekil 4.10. Kersetin'in kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ppm konsantrasyonda cihaza enjekte ederek pik alanları hesaplandı. Şekil 4.11.'de kateşinin kalibrasyon eğrisi görülmektedir.



Şekil 4.11. Kateşin'in kalibrasyon eğrisi

Metanolik ekstraktların (1, 4) ve etanolik ekstraktların (2, 5) HPLC kromatogramı, *L. aestivum*'un Tablo 4.3.'da gösterildiği gibi, gallik asit, kateşin ve kersetin varlığını gösterdi. En çarpıcı sonuç 1 numaralı ekstrakta yüksek oranda gallik asit, 2 numaralı ekstrakta kateşin ve 4'ünde kersetin saptanmasıydı. *L. aestivum*'un 3 numaralı toprakaltındaki hekzan ekstresi, gallik asit ve kateşin varlığını ortaya çıkarırken, hekzan ekstraktlarının topraküstü kısmında sadece kateşin bulundu belli sınırdan altında bulundu.

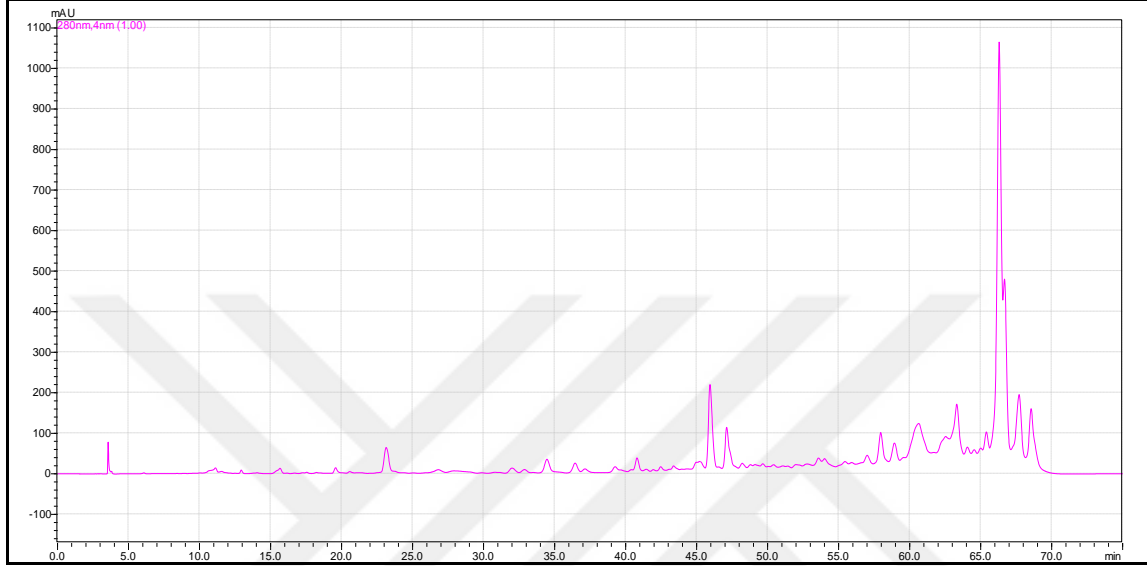
Çizelge 4.3. Gallik asit, kateşine ve kersetin miktarı için *L. aestivum* ekstraktların HPLC sonuçları

Ekstrakt	Gallik asit	Kateşin	Kersetin
R <sup>2</sup>	0,9933	0,9945	0,9875
t <sub>R</sub>	15,79±0,8	35,21±0,6	53,35±0,7
1 Alan%	31,686	5,031	9,307
1 Ağırlık%	21,367	4,435	1,995
1 Konsantrasyon	6,936	9,921	0,68
2 Alan%	1,486	14,931	TE <sup>1</sup>
2 Ağırlık%	0,821	10,920	TE
2 Konsantrasyon	0,258	10,113	TE
4 Alan%	24,101	5,895	11,931
4 Ağırlık%	15,439	4,257	2,448
4 Konsantrasyon	0,241	8,063	TE
5 Alan%	TE	10,346	TE
5 Ağırlık%	TE	3,077	TE
5 Konsantrasyon	TE	4,605	TE
3 ve 6	TE	TE	TE

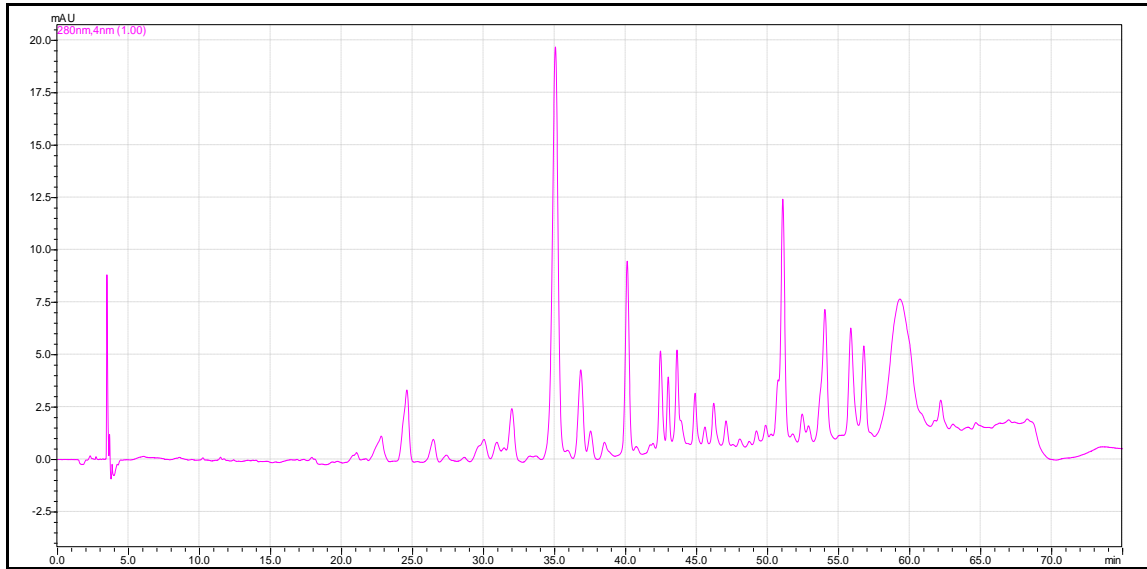
TE<sup>1</sup>: Tespit Edilemedi

#### 4.5.1. *Leucojum aestivum* örneklerinin kromatogramları

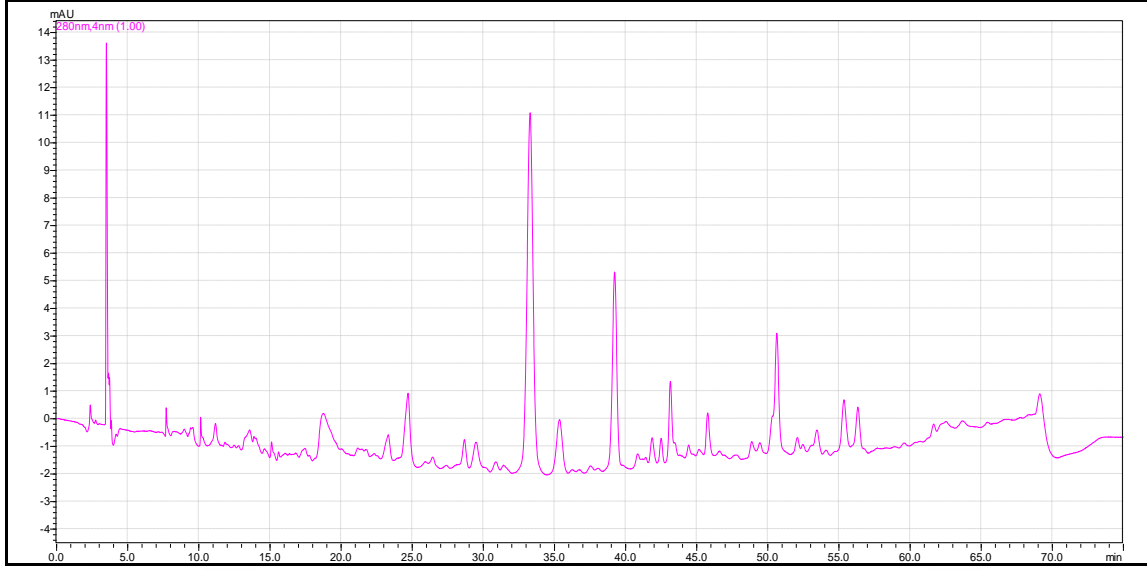
Sokset ekstraksiyon yöntemlerine göre elde edilmiş *L. aestivum* toprakaltı ve topraküstü kısımları ekstratları için HPLC’de analizi yapılmıştır. Kromatogramları aşağıdaki gibi elde edilmiştir.



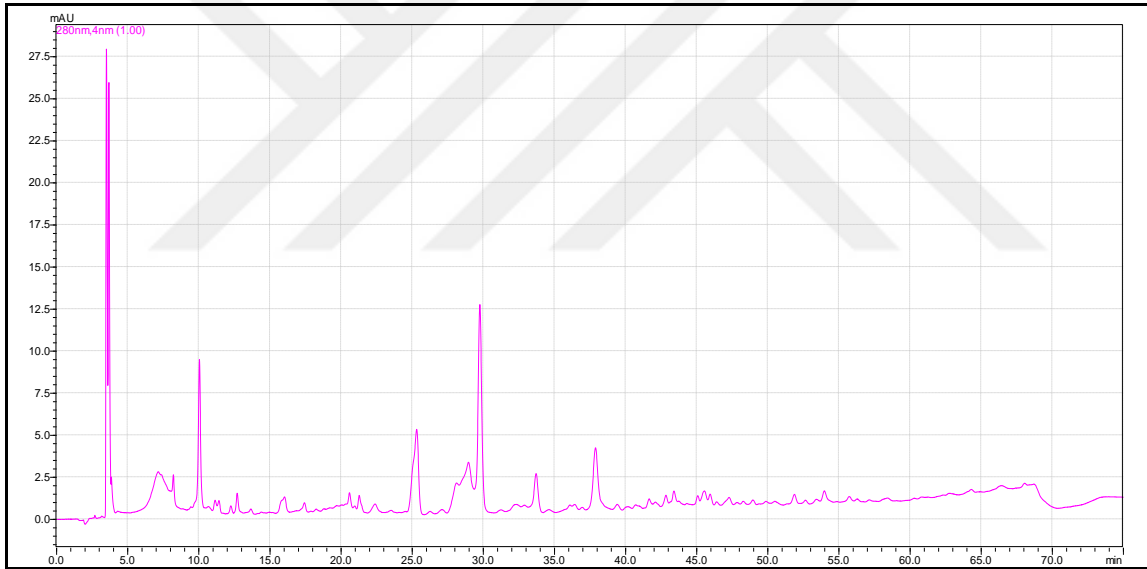
Şekil 4.12. *Leucojum aestivum* toprakaltı metanol ekstraktı kromatogram görüntüsü



Şekil 4.13. *Leucojum aestivum* topraküstü etanol ekstraktı kromatogram görüntüsü



Şekil 4.14. *Leucojum aestivum* topraküstü metanol ekstraktı kromatogram görüntüsü



Şekil 4.15. *Leucojum aestivum* toprakaltı etanol ekstraktı kromatogram görüntüsü

Yukarıdaki kromatogram diagramları geleneksel yöntem ile yapılmış *L. aestivum* toprakaltı etanol, toprakaltı metanol, topraküstü etanol, topraküstü metanol örneklerini göstermektedir.

#### 4.5.2. *Leucojum aestivum* örneklerine ait bulgular

Kromatogramlarda seçilen fenolik standartlarının yerleri belirlenerek pik alanı yüksekliği gibi hesaplamalar yapılmış ve tabloya geçirilmiştir. Fenolik standart miktarları çizilen



kalibrasyon eğrilerine bağlı olarak bulunmuştur. Sokslet yöntemiyle yaklaşık 8-9 saatlik ekstraksiyon süresiyle elde edilen *L.aestivum* bitkisine ait topraküstü ve toprakaltı ekstraktlarının ana bileşenlerle yüzde olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Bu metotta yapılan karşılaştırmada gallik asit, kersetin ve kateşin kendi arasında yüzde olarak karşılaştırılmıştır.



## 5. TARTIŞMA

Amaryllidaceae familyasına ait türlerde ve özellikle *Leucojum aestivum*' da bulunan alkaloidlerin biyolojik aktiviteler üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir. Son yıllarda, bitki bazlı biyolojik olarak aktif kimyasal bileşiklerin önemi bilim adamları tarafından tartışma konusu haline gelmektedir. Farmasötik bileşiklerin geliştiği dünyamızda bitki, doğaya taklit ve ilaç olarak kullanımda önemli bir faktör olarak düşünülmüştür. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, yaygın olarak kullanılan biyolojik olarak aktif metabolitler olan flavonoidler, fenolikler gibi sekonder metabolitlere yönelmiştir. *L. aestivum* ile ilgili yapılan çalışmalar, sadece galantaminin etkinliği üzerine gerçekleştirilmiştir. Şimdiye kadar, *L. aestivum* ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ile kimyasal bileşimlerin belirlenmesi üzerine hiçbir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada ele alınan ana hedef bitki ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal özellikler, DNA etkileşimleri ve HPLC ile kimyasal bileşimlerin tanımlanmasını içermektedir.

Bugüne kadar *L. aestivum* türünün farklı populasyonlarından elde edilen yaprak ve soğanların alkaloid çeşitliliği üzerine yapılan çalışmalar sadece TLC ile gerçekleştirilmiştir. Yakın zamanda ise bu bitkinin *in vitro* ile elde edilen sürgünlerinin galantamin içeriği HPLC analizleriyle tespit edilmiştir. Amaryllidaceae alkaloidlerinin kompleks bileşimlerinin ayrılması ve tanımlanması için kapiler GC-MS yöntemi kullanışlı ve güvenilir bir metod olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra galantamin dışında farklı coğrafik bölgelerde yetişen *L. aestivum* türünün 23 alkoloide sahip olduğu bilinmektedir (Georgieva, Kondakova, Bastida, Viladomat, Atanassov and Codina, 2007; Berkov, Pavlov, Ilieva, Burrus, Popov and Stanilova, 2005). Bizim yaptığımız bu çalışmada fonksiyonel grupları belirlemek için TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) ve standart olarak kullanılan gallik asit, kateşin ve kersetin bileşiklerinin *L.aestivum*'un toprakaltı ve topraküstü bitki ekstraktlarındaki miktarını belirlemek için ise HPLC(Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile çalışıldı.

Süs bitkisi olarak bahçe düzenlenmesinde kullanılan *L. aestivum* türünün tıbbi ve farmakolojik açıdan oldukça değerli bir bitki olduğu anlaşılmış ve Türkiye'deki habitatları çarpık kentleşmenin yanısıra çevre kirliliğinden dolayı yok olma tehlikesiyle karşı karşıya

kalmıştır. *L. aestivum* bitkisinin embriyolojik özelliklerinin bilinmesi hem filogeni açısından hem de makromoleküler düzeyde hücre farklılaşmasına ışık tutması açısından oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca bu çalışmadan elde edilecek verilerle günümüzde Amaryllidaceae familyasının taksonomik özelliklerine katkı sağlanması amaçlanmıştır (Ekici, 2006). Galanthaminin sentezlenmesi zor ve ekonomik olmadığından yapılan çalışmalar bu maddenin biyosentez yollarının araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. *L. aestivum* bitkisinin galantaminin yanısıra licorin, tazettin ve bunların türevleri olan birçok alkaloid içerdiği bilinmektedir.

Yapılan çalışmalarda bitkinin asetilkolin esteraz (AChE) inhibisyon aktivitesi, antibakteriyal, antifungal, antimalarial, antiplatelet aktiviteleri, insektisit ve sitotoksik özellikleri incelenmiştir. Bitkide bulunan galantaminin ve onun türevi olan birçok bileşiğin asetilkolinesteraz inhibisyonunda rol oynadığı görülmüştür. *L. aestivum* 'un alkaloidleri arasında, AChE inhibisyon aktivitesi özellikle galantamin ve türevleri ile ilişkili olup galantamin türevi sanguinin (9-*O*-dimetilgalantaminin) ise galantamine göre daha aktif bir asetilkolinesteraz inhibitörü olduğu araştırmalar sonucu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen habrantin, sanguinin ve 1-*O*-asetillikorinin aktivitesi incelenmiş ve bunun sonucunda galantaminden daha fazla aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir (Karuncula, 2013).

Antioksidan aktivitenin saptanmasına yönelik birden fazla yöntem mevcuttur. *Sternbergia fischeriana* (Herb.) rupr. bitkisinin alkaloidlerinin kimyasal analizi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş çalışmada antioksidan aktivite tayini için DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla *Sternbergia fischeriana* bitkisinin soğanlarından elde edilen ekstraktların DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, konsantrasyon arttıkça artmış ve standart olarak kullanılan BHT (butillenmiş hidroksitoluen) ve  $\alpha$ -Tokoferol ile oldukça yakın sonuçlar vermiştir (Baygar, 2010). Bizde antioksidan aktivite belirlemek için çalıştığımız DPPH metodu ile konsantrasyon arttıkça radikal süpürücü aktivitenin arttığını ve standart olarak kullanmış olduğumuz Askorbik asit, Butillenmiş hidroksianisol ve resorsinol ile oldukça yakın sonuçlar elde ettiğini gözlemledik.

Standart olarak askorbik asit, butillenmiş hidroksianisol ve resorsinol kullanarak yapmış olduğumuz çalışmada DPPH (serbest radikal sönmeme aktivitesi) yöntemi ile farklı

konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının oldukça yüksek serbest radikal sönümlenme aktivitesinin olduğunu gözlemledik. Ayrıca elde ettiğimiz DPPH sonuçları *L. aestivum*'un 5 numaralı toprakaltı etanol bitki ekstraktının diğer bitki ekstraktlarına göre daha iyi IC50 değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Serbest radikal DPPH'ı % 50 azaltmak için gereken antioksidan konsantrasyonu olan [IC] 50 değerleri, 1, 2, 3, 4, 5, 6 için sırasıyla 317, 169, 167, 345, 144 ve 442 olarak hesaplanmıştır.

*Sternbergia lutea* Waldst ve Kit ile yapılan başka bir çalışmada DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite belirlenmiş ve türün soğan ve yapraklarından elde edilen etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesini ve fenolik bileşen madde miktarını araştırılmıştır. Soğan ekstraktları (% 86.60) yaprak ekstraktlarından (% 68.10) daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Serbest radikal süpürücülük aktivite testinde ise benzer şekilde soğan ekstraktında (%64.29) yaprak ekstraktından (%42.8) daha yüksek serbest radikal süpürücülük aktivite belirlenmiştir. Bizde *leucojum aestivum* toprakaltı ve topraküstü ekstraktları ile yapmış olduğumuz çalışmada toprakaltı ekstraktlarının topraküstü ekstraktlarından daha iyi sönümlenme aktivitesi belirlendi. Bu çalışmanın verileri bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino grup asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC analizlerinde karışım halindeki numune mobil faz ile kolondan geçirilerek bileşenlerine ayrılır.

Galantaminin Alzheimer hastalarında, beynin kolinerjik nöronlardan yoksun bölgelerinde asetilkolin konsantrasyonunu arttırdığı görüldüğünden bu hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Morfin kadar güçlü bir ağrı kesici olan galantamin, ayrıca merkezi sinir sistemini uyarıcı özelliğe de sahiptir ve göz damlalarında göz tansiyonunu düşürmek amacıyla kullanılmaktadır. Eczacılıkta birçok ilacın hammaddesini oluşturan galantamini elde etmek zor ve pahalı bir işlemdir. Bu sebeple, galantaminin tıbbi uygulamalarda kullanılmasını daha ekonomik hale getirmek için *L.aestivum*'da galantaminin biyosentez yolları araştırılmıştır (Ekici, 2006).

Galantamin ölçümü için en çok rapor edilen yöntem Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) olmuştur. Bunun yanında HPLC' nin kompleks alkaloid karışımları ayırma kapasitesi yaklaşık 5-7 civarında olduğundan sınırlıdır. Alkaloid kompozisyonları çok fazla olduğu için (*Narcissus* cinsinde 100'den fazla alkaloid bulunmaktadır) alkaloid kompozisyonlarına göre ayırma koşullarının optimize edilmesi gerektiği öngörülmektedir (Georgieva ve diğerleri, 2007). Yapılan başka bir çalışmada *Sternbergia sicula* (Tineo ex Guss) bitkisinin kalite kontrol açısından değerlendirilmesi için alkaloid içeriği Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılarak tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda bitki ekstraktlarının topraküstü kısmında likorin alkaloidinin çiçekli dönemde yoğun olarak bulunduğu galantamin ise rastlanmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca *Sternbergia sicula* bitkisinde; hemantamin, hemantidin ve 11 Hidroksivittatine alkaloidlerinin varlığı da bu yöntemle tespit edilmiştir (Çiçek, 2010).

*L.aestivum*, içerdiği alkaloidleri ile ekonomik önem taşımakta fakat yeterince korunamadığından geniş ölçüde yurt dışına ihraç edilmektedir. Yapılan gözlemler sonucunda, bu bitkinin özellikle Balık Gölü ve Terme'den kaçak olarak toplandığı ve Bulgaristan'a ihraç edildiği saptanmıştır ( Kutbay ve diğerleri, 1994). Bulgaristan'da 2001-2002 yılları arasında Ekici ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada da *L. aestivum*'un galantamin içeriği araştırılmış ve bu çalışmada galanthamin içeriği bakımından ekonomik değeri olan yedi lokalite taranmıştır. Bunun için *L. aestivum* populasyonlarından 80'den fazla yaprak örneği alınmış ve HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemi ile analiz edilmiş, bunun sonucunda galantamin içeriğinin 0.06 ve 0.37 mg (DW; kuru ağırlık) arasında değiştiği gözlenmiştir. Galantamin içeriğine göre *L. aestivum* populasyonları; düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve bu verilerin lokalitelerin dağılımı ile kısmen uyumluluk gösterdiği bildirilmiştir (Ekici, 2006). Yapılan bir çalışmada ülkemizde Muğla ve çevresinde doğal olarak yetişen *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. alt türünün topraküstü kısımları ve soğanları çiçekli dönemde toplanmış ve fitokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Amaryllidaceae familyasının biyolojik aktivite açısından önemli olan alkaloidleri galantamin ve likorin, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinden hazırlanan topraküstü ve soğan örneklerinde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak araştırılmıştır. Bunun sonucunda, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinin 23 adet alkaloid içerdiği saptanmıştır (Karakoyun, 2018). Çalışmamızda *L.aestivum* toprakaltı ve topraküstü ekstraktların

biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için HPLC yöntemini kullanarak kimyasal bileşimlerin tanımlanmasını amaçladık. Çalışmamız için antioksidan aktiviteler solvent polaritesi ve bitki kısmı tarafından kontrol edilmiştir. Saptanan diyot dizisi ile HPLC metodu, *L. aestivum*'un altı farklı ekstraktlarında (1, 2, 3, 4, 5, 6) gallik asit, kateşin ve kersetin kantitatif tayini için geliştirilmiştir. HPLC ve toplam fenolik flavonoid içeriği sonuçlarının antioksidan aktivite sonuçları ile korele olduğu görülmüştür. Çalışmamızda *L.aestivum* toprakaltı ve topraküstü ekstraktların biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için HPLC yöntemini kullanarak kimyasal bileşimlerin tanımlanmasını amaçladık.

*L. aestivum* türünde galantaminin ve öncü maddelerinin bitkideki dağılımı Eichhorn ve ark. (1998) tarafından incelenmiştir. Bunun sonucunda kök, gövde ve soğanda bu maddelerin bulunmadığı, yaprakta az miktarda öncü madde bulunduğu, çiçek sapı ve ovaryumun ise bu maddeler bakımından zengin olduğu ve petallerde az miktarda bulunduğu gözlenmiştir. Ülkemizde de Amaryllidaceae alkaloidleri ile ilgili yapılan çalışmalara örnek Samsun da yapılan çalışmadır. Bu çalışmada, çiçeklenme ve meyve bağlama dönemlerinde *L. aestivum*'un soğanlarındaki alkaloid miktarı belirlenmiştir. Ayrıca bitkinin yaygın olarak bulunduğu yerlerde populasyon sayımları da yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda meyve döneminde alkaloid miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu safhada topraküstü kısımları çürümeye başlamakta ve azot, fosfor, potasyum gibi temel besin elementleri, toprakaltı kısımlara taşınmakta olduğundan çiçeklenme döneminde topraküstü kısımlarda gerçekleşen aktif metabolik olayların, meyve döneminde toprakaltı kısımlarda gerçekleştiği görülmüştür. Buna bağlı olarak meyve döneminde soğanların alkaloid içeriği fazla bulunmuştur. Biz ise çiçeklenme döneminde *L.aestivum* toprakaltı ve topraküstü bitki kısımlarından toprakaltının topraküstü kısımlarından daha çok aktivite gösterdiğini gözlemledik . Bu çalışma bizim çalışmamızın sonucunu desteklememektedir.

Karadeniz tarımsal araştırma enstitüsünün saha alanlarından *Leucojum aestivum*'dan rastgele 200 yaprak seçilerek yapılan çalışmada *L. aestivum*' un bitki başına yaprak sayısı ve soğan verimi arasında pozitif ve anlamlı bir ilişki olduğunu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada bir yaprak alanı geliştirmek için tahmini model belirlenerek yaprak genişliği, yaprak alanı ve yaprak uzunluğu belirlenmiştir. Bitki yaprak alanı PLACOM dijital planimetre ile ölçülmüştür ve çoklu analizleri Excel 7.0 de hesaplanmıştır. Sonuç olarak aktif ve tahmin edilen yaprak arasında yakın ilişki olduğu buna bağlı olarakta mevcut

modelin farklı büyüme periyotlarından toplanan yaprak örnekleri ile değerlendirilebileceği gözlenmiştir (Çırak ve diğerleri, 2005).

*L. aestivum*'un in vitro sistemlerinde büyüme ve galantamin birikimi incelenmiştir. Birikmiş galantaminin miktarının, farklılaşma seviyesine kuvvetle bağlı olduğu tespit edilmiştir. Aydınlatma altında gerçekleştirilen *L. aestivum* 80 sürgün kültürünün batık ekim gününden 35 gün sonra elde edilen verilere göre biyokütlenin maksimum verimi (17.8 g / L) ve maksimum miktarda birikmiş galantamin (2.5 mg / L) olarak elde edilmiştir. *L. aestivum* sürgün kültürünün yetiştirilmesi sırasında ortamın ana besin bileşenlerinin kullanımının zamana bağlı olarak ilişkisi araştırılmıştır. Bu, *L. aestivum*'un in vitro sistemlerinde galantamin biyosentezine ilişkin çeşitli ilişkileri açıklayan ilk rapordur. Elde edilen iki katına çıkma süresi, özgül büyüme oranı, büyüme verimi ve galantamin üretkenliği *L. aestivum* sürgünlerinin batık ekimi, galantamin üretimi için ileriye dönük alternatif bir yaklaşım olarak düşünülebileceğini göstermektedir. Elde edilen veriler, *L. aestivum* 'da artan galantaminin 80 sürgünün meydana gelmesini ve besin ortamı kompozisyonunun verimlilik için optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Pavlov ve diğerleri, 2007).

Farklı biyoreaktör sistemlerinde yetiştirilen *L. aestivum* sürgünleri ile galantamin üretimini (farklı kültür koşullarında çalkalama ve nonshaking parti kültürü, geçici daldırma sistemi, kabarcık biyoreaktör, sürekli ve süreksiz gazlama biyoreaktör) incelemiştir. Besin ortamının, inokulumun ağırlığının ve biyoreaktörün hem büyüme hem de galantamin üretimindeki etkisi incelenmiştir. Makro elementleri ve mikro elementleri standart MS ortamının yarısına indirmek veya besin ortamındaki nitrojen içeriğini azaltmak, büyüme oranını ve büyüme indeksini hafif düşürmüş ve kontrol grubuna göre kuru ağırlık yüzdesini arttırmıştır. Ortamdaki sukroz miktarı arttığında, kontrol ile ilgili olarak büyüme oranı ve büyüme indeksi için önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Kültür ortamında bulunan besi yerinde sukrozun artması, *N. confusus*'un DW (kuru ağırlık)'nın yüzdesini ve su altı kültüründe yetiştirilen *Narcissus pseudonarcissus* ve *Leucojum aestivum* filizlerinin büyümesi ve gelişmesini uyardığı bulunmuştur. Bununla birlikte, bu çalışmada rapor edilen galantamin içerikleri önceden rapor edilen üretim seviyelerini aşmaktadır. Sonuç olarak, farklı kültür koşullarının yanı sıra biyoreaktör hacimleri ve büyüklükleri ile galantamin üretimini geliştirmeye yönelik daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir (Schuman ve diğerleri, 2012).

*L. aestivum* filiz kültürü ile galantamin ve ilgili alkaloid üretim sürecini geçici bir daldırma sistemi ile ilgili yapılan çalışmada geçici daldırma yaklaşımının, değerli Amaryllidaceae alkaloidlerinin elde edilmesi için ve biyosentez işleminin geliştirilmesi için ileriye dönük önemli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hem sıcaklık hem de daldırma frekansının *L. aestivum* 80 sürgün kültürüyle galantamin üretimini etkilediğini ve hücrelerde biriken galantaminin ve kültür ortamının galantamin içinde salgılanan oran üzerinde etki yapmadığı gözlenmiştir. Buna göre, incelenen değişkenlerin (daldırma frekansı ve sıcaklık) *L. aestivum*'un 80 sürgün kültürünün alkaloid biyosentezini önemli ölçüde etkilediğini açıkça ortaya koymaktadır. İstatistiksel regresyon modeli ile elde edilen sonuçlara göre, geçici daldırma teknolojisinin değerli alkaloidlerin elde edilmesi için daha da geliştirilmesi gerektiği ortaya konmuştur (Ivanov ve diğerleri, 2011).

Edirne-Tavuk Ormanında doğal olarak yetişen *L. aestivum*'un megasporangium gelişimi, megasporogenez, megagametogenez, dişi gametofitleri sitolojik ve histolojik olarak incelenmiş ve gametofit gelişiminin normal olduğu tespit edilmiştir. Çekirdek ve embriyo kesesi tipleri *Leucojum* ve *Galanthus*'da bazı farklılıklar göstermektedir. Sinerjitler, yumurta hücresi ve fonksiyonel megasporlarda polarite belirlenmiştir. *L. aestivum*'un yumurtacığı anatropous, bitegmic ve crassinucellate tipindedir. İç integument, Micropyle'ı oluşturur. Archesporial hücre doğrudan bir megasporositeye dönüşür. Embriyo kesesi gelişimi bisporik Allium tipindedir. Sinerjitlerde filiform aparat gözlenir. Kutupsal çekirdekler, gübrelemeden önce, antipodallerin yakınında ikincil çekirdeğin oluşmasını sağlar. Bu çalışmadan elde edilen veriler, aynı zamanda taksonomide kullanılan embriyolojik özelliklere de katkıda bulunacaktır (Ekici ve Dane, 2008).

Bulgaristanda yapılan çalışmada, *L. aestivum*'un, bakteriyel çürük belirtileri incelenmiştir. Patojenite testleri, fizyolojik özellikler, PZR temelli yapılan çalışmalar sonucunda *L. aestivum*'un bakteriyel çürümesinin temel nedeninin, *Burkholderia gladioli* ve *Pseudomonas marginalis* olduğu tespit edilmiştir. Nehirlerin kirlenmesinin temel nedeninin soğanlı bitkilere bulaşan, toprakta ve suda yaşayabilen patojenlerin bu ortamlara bulaşması sonucu olabileceği ve böylece doğal *L.aestivum* alanlarının bozulmasına neden olabileceği ileri sürülmektedir. (Stoyanova, Georgieva, Moncheva ve Bogatzevska, 2012).



İlaç endüstrisinde ilaç üretiminde hammadde olarak kullanılan *L. aestivum* L.'nin vitro klonal çoğaltımı için 24 klon çoğaltılmış ve yayılma katsayısı, sürgün ve soğancık morfolojisi, alkaloid profili ve galantamin, likorin ve dört ilgili alkaloid içeriği değerlendirilmiştir. Ticari olarak önemli popülasyonlar ile mukayese edilebilir olan in vitro klonların yüksek galantamin konsantrasyonları, alternatif bir alkaloid kaynağı olarak kullanılmaları için iyi bir ön koşul olduğu gözlenmiştir. Ortam kompozisyonunun ve kültür koşullarının iyileştirilmesi seçilen klonların in vitro ortamda galanthamin üretiminin artırılabilceği sürülmüştür (Bogdanova ve diğçerleri, 2009).

Yapılan araştırmada in vitro galantamin biyosentezi büyüme düzenleyicileri, ortam bileşçenleri, kültür koşulları ve biyoreaktör sistemleri konusundaki son teknoloji gözden geçirilmiştir. Galantamin ve Amaryllidaceae alkaloitlerinin farklı eksplantlardan elde edilen filiz kültürleri ile biyosentezi (soğçanlar, genç meyve ve tohumlar) araştırılmıştır. Bitki in vitro sistemleri, galantamin biyoüretimi için bir alternatif FT-IR. Bununla birlikte, elde edilen verimler hala çok düşüktür ve ilaç endüstrisi için cazip değildir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için süreç optimizasyon ile entegre bir yaklaşım uygulanmalıdır. Böyle bir yaklaşımda kritik bir nokta, sürgün yetiştirme için uygun biyoreaktör tasarımının geliştirilmesidir (Berkov ve diğçerleri, 2014).

Galantamin ekstraksiyonu için kullanılan bitkilerin fitokimyasal incelemeleri, galantamin maddelerinin bitki kaynağını kontrol etmek için kullanılabilen kompleks ve değışçken alkaloid kalıplarını ortaya çıkarmıştır. Alkaloid karışımlarda daha yüksek oranda galantamin sahip ürünlerin piyasaya sürülmesi de ilgi çekicidir. Bunun, bileşçenin izolasyonunu ve saflaştırılmasını kolaylaştıracak ve ekstraksiyon maliyetlerini azaltacağı öngörülmektedir. Bu bağlamda, hem ekinlerde hem de in vitro kültürlerde O-metilnorbelladin'in para-orto oksidatif bağlamasından gelen ürünlere yol açan biyosentetik yolun genetik manipülasyonu hala keşfedilmemiş bir alan olmasından ve galantamin sentezinin in vitro çalışmaları başlangıç aşamasında olduğundan diğçer galantamin üreten türlerin tanıtımı ve galantamin bakımından zengin genotiplerin seçimi in vitro biyoreaktör yetiştirme koşullarının optimizasyonu ile birlikte uygulanması gerektiğini ileri sürmüşçlerdir (Berkov ve diğçerleri, 2009).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda Amaryllidaceae familyasına ait diğer türlerde ve *L. aestivum* alkaloidlerin biyolojik aktiviteleri üzerine çalışmalar artmıştır. *L. aestivum* Amaryllidaceae familyasının önemli bir türüdür. *L. aestivum* 0-1100 m arasında nemli çayırliklarda ve bataklık alanlarda yayılış göstermektedir. *L. aestivum* ülkemizde İstanbul, Kocaeli, Beyşehir, Bursa, Bolu, Konya, Erzurum ve Samsun olmak üzere 8 ilde yayılış gösterir (Davis ve diğerleri, 1984). *L. aestivum* türü sahip olduğu galantamin gibi değerli alkaloidleri nedeniyle biyokimyasal ve medikal araştırmalarda yoğun olarak kullanılan, tıp alanında önemli bir yere sahip olan türdür. Galantamin, Alzheimer, poliomyelitin, çocuk felci, yaşlılık demansının semptomatik tedavisi ve diğer nörolojik hastalıklar için kullanılan geri dönüşümlü, rekabetçi ve uzun etkili bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür.

Günümüzde bitki bazlı biyolojik olarak aktif kimyasal bileşikler önemli bir tartışma konusu haline gelmiştir. Farmasötik bileşiklerin geliştiği tarihte bitki, doğaya taklit ve ilaç malzemelerinin izolasyonunda önemli bir faktör olarak düşünülmüştür. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, yaygın olarak kullanılan biyolojik olarak aktif metabolitler olarak flavonoidler, fenolikler gibi sekonder metabolitlere yönelmiştir. *L. aestivum*'daki çoğu çalışma, sadece olumlu etkileri olarak galantamin sunan az sayıda spesifik alanda gerçekleştirilmiştir. Şimdiye kadar, *L. aestivum* ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ile kimyasal bileşimlerin belirlenmesi ile ilgili hiçbir araştırma yapılmamıştır.

Doğal antioksidanların en önemli kaynağını bitkiler oluşturmakta olduğundan bitkisel kaynaklı besinlerin kullanılması özendirilerek artmaktadır. Antioksidanlar moleküler düzeyde çok büyük çeşitlilik göstermekte olduğu için antioksidan maddelerin bitkilerdeki miktarlarını ve dağılımlarını araştırmaya olan ilgi ve araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu araştırmalar sonucunda yüksek antioksidan aktivite gösteren molekülleri içeren bitkisel kaynaklı besinler önerilmektedir. Bu amaçla Amaryllidaceae familyasının üyelerinden biri olan *L.aestivum* bitkisi tıbbi bitki olma potansiyeli tespit edilmek üzere toplanarak temizlenip kurutuldu. Bitkinin toprakaltı ve topraküstü kısımları ayrılarak etanol, metanol, hekzan çözücülerini ile ekstraktları hazırlandı. Ekstraktların antioksidan etkileri 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), demir indirgeme, metal şelatlama, total flavonoid, total fenolik

yöntemleri ile tayin edildi. Elde edilen sonuçlar, kontrol olarak kullanılan butillenmiş hidroksianisol (BHA), gallik asit, kersetin, resorsinol ve askorbik asitin antioksidan etkileri ile karşılaştırıldı. Ekstraktların total fenol miktarları belirlenerek, değişik dalga boylarında HPLC analizi ile pik alanları tespit edildi. HPLC ile hazırlanan ekstraktlardaki kateşin, kersetin flavonoidleri ve gallik asit fenolik bileşeni miktarı belirlendi. Topraküstü ve toprakaltı ekstraktlarının FT-IR analizi sonuçlarına göre alifatik ve aromatik bölgelerde pikler görülmüştür. Toprakaltı ekstraktlarında NH grubuna rastlanmamıştır. TLC sonuçlarına göre topraküstü ekstraktlarında florosan özellik gösteren bileşenlerin olduğu görüldü. Ayrıca flavonoid özellik gösteren maddelerin varlığı bulunmuştur.

Standart olarak askorbik asit, butillenmiş hidroksianisol ve resorsinol kullanarak yapılan çalışmada DPPH (serbest radikal sönmeme aktivitesi) yöntemi ile farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının oldukça yüksek serbest radikal sönmeme aktivitesinin olduğu gözlemlendi. Ayrıca elde ettiğimiz DPPH sonuçları *L. aestivum*'un 5 numaralı toprakaltı etanol bitki ekstraktının diğer bitki ekstraktlarına göre daha iyi IC50 değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Serbest radikal DPPH'ı % 50 azaltmak için gereken antioksidan konsantrasyonu olan [IC] 50 değerleri, 1, 2, 3, 4, 5, 6 için sırasıyla 317, 169, 167, 345, 144 ve 442 olarak hesaplanmıştır.

EDTA ve gallik asit pozitif standartlarını kullanarak gerçekleştirmiş olduğumuz bitki ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi bakımından analizlerinde ise 1, 2, 4, 5 numaralı toprakaltı ve topraküstü metanol ve etanol ekstraktlarından 3 ve 6 numaralı toprakaltı ve topraküstü hekzan ekstraktlarına göre daha başarılı sonuçlar elde ettik. Antioksidan aktivitenin belirlenmesine yönelik yapmış olduğumuz başka bir çalışma olan indirgeyici aktivite için standart olarak Asc (askorbik asit), ve BHA (butillenmiş hidroksianisol) 'ı kullandık. İndirgeyici aktivitesi en yüksek olan bitki ekstraktı, 2 numaralı toprakaltı etanol ekstraktı iken, 1 numaralı toprakaltı metanol ekstraktı onu takip etmektedir. Daha sonra ise 5 numaralı ekstrakt olan topraküstü etanol gelmekte ve onu 4 numaralı bitki ekstraktı olan topraküstü metanol ekstraktı takip etmektedir. 3 ve 6 numaralı toprakaltı ve topraküstü hekzan ekstraktlarının ise indirgeyici aktivitesinin oldukça az olduğu görülmüştür. Toprakaltı ve topraküstü bitki ekstraktlarının fenolik ve flavonoid içeriğini incelediğimizde ise toplam fenolik içeriğin en yüksek değeri 5 numaralı topraküstü etanol ekstraktı iken, 1 numaralı toprakaltı metanol ekstraktının daha yüksek toplam flavonoid içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmamız için antioksidan aktiviteler solvent polaritesi ve bitki kısmı tarafından kontrol edilmiştir. Saptanan diyot dizisi ile HPLC metodu, *L. aestivum*'un altı farklı ekstraktlarında (1, 2, 3, 4, 5, 6) gallik asit, kateşin ve kersetin kantitatif tayini için geliştirilmiştir. HPLC ve toplam fenolik flavonoid içeriği sonuçlarının antioksidan aktivite sonuçları ile korele olduğu görülmüştür. Etanol ve metanol ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri için büyük bir potansiyeli olduğu görülmüştür ve anti-inflamatuar bileşik tasarımı kullanılabılırler. Bir diğer önemli detay, DNA etkileşimi sonuçları ile oldukça ilgili olan MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) sonuçlarıdır. *L. aestivum*, çiçeklenme döneminde toplandığında, öğütülmüş bitki parçalarının toprakaltı özlerinin, topraküstü özlerinden daha fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Bazı sekonder metabolitler sıklıkla stres durumunda bitkilerde görülür. *L. aestivum*'un çiçeklenme döneminde, toprakaltı bitki parçalarının etanol özleri diğerlerine göre daha fazla sekonder metabolit içerir. Son olarak, toprakaltındaki *L. aestivum* parçalarının etanol özlerinin biyolojik aktivitesi, flavonoid / fenolik içeriğin ve miktarın sinerjistik etkilerine bağlı olarak diğerlerinden daha yüksektir. Bu çalışma ile antioksidan ve antimikrobiyal özellikler, DNA etkileşimleri ve HPLC ile kimyasal bileşimlerin tanımlanmasını içeren bu ekstraktların biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile *L. aestivum* ekstraktlarının yüksek fenolik ve flavonoid içeriği ile yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ve antimikrobiyal aktivite sonuçlarının DNA etkileşimi ile ilişkili olduğu belirlenmiş oldu. Ekstraktların kızılötesi spektroskopisi FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ile analiz edilmiştir. Fonksiyonel grupları belirlemek için TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) kullanılmıştır. Bu çalışmanın ile doğal bileşiklerden antioksidan ve antimikrobiyal aktivite sergileyen bileşik gruplarının ekstraksiyonları üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlayacak bir çalışma olacaktır. Çünkü yapmış olduğumuz bir sürü çalışma ile sonucu destekledik.

*L. aestivum* L. (göl soğanı), farmakolojik olarak aktif alkaloidler üreten ilginç farmakolojik özelliklere sahip olduğundan, ekonomik bir girdi oluşturmaktadır. Farmasötik endüstriler, galantamin ve *L. aestivum* bitkileri ile özellikle ilgilenirler ve bu da bitkinin talebini artırır. Farmasötik pazarın artan talebi ve bitki kaynaklarının sınırlı bulunabilirliği göz önüne alındığında *L.aestivum* yok olma tehlikesiyle karşı karşıya gelmiştir. Bitkiden in vitro kültürler kullanılarak üretilen galantamin gibi değerli alkaloidler alternatif bir yöntem

olabilir. Tıbbi bitkilerin ekonomik değerinin araştırılması üzerine yapılacak tüm çalışmalar farkındalığı artırarak bitki genetik kaynaklarının kullanımı ile ilgili sürdürülebilir politikaların uygulanmasına katkı sağlıyacaktır. Kanıtlanmış alkaloid profillerine sahip türlerinin in vitro depolanması sonucunda habitat baskıları azalacak ve türlerin tahribatı önlenecektir. Bu tür politikaların geliştirilmesinin talepi aşırı derecede artırması nedeniyle yok olma tehlikesine karşı bu değerli tıbbi bitkinin hem sanayi hem de doğal kaynak olarak korunabilmesi ve hızlı bir şekilde yayılabilmesi için temel öneme sahiptir. Galantamin in vitro üretimini optimize etmek için bugüne kadar yürütülen çalışmalar olmasına rağmen, bunun yanı sıra alkaloidlerin teorik verilerinin tahmini ile ilgili daha ekonomik çalışmalar artırılmalıdır. Genetik ve mühendislik alanlarındaki çalışmalarda üretkenliği en st düzeye çıkaracağı için desteklenmelidir. Yapmış olduğumuz bu çalışmanın antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında katkı sağlamasını mit ediyoruz.

## KAYNAKLAR

- Abou-Donia, A. H., Toaima, S. M., Hammada, H. M., Shawky, E., Kinoshita, E., and Takayama, H. (2008). Phytochemical and biological investigation of *Hymenocallis littoralis* SALISB. *Chemistry and biodiversity*, 5(2), 332-340.
- Adewusi, E. A. and Steenkamp, V. (2011). In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(10), 829-835.
- Akyüz, T.K. (2006). *Hipertiroidizm ve Hipotiroidizm Olgularında Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006). Afyon, 41-43.
- Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4), 401-409.
- Altaş, S. (2009). *Abies Clícia (Köknar) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009). Diyarbakır, 4-37.
- Altaş, S. (2009). *Cedrus Libani (Sedir) ve abies Clícia (Köknar) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009). Diyarbakır, 4-32.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5-16.
- Antmen, Ş.E.(2005) . *Beta Talasemide Oksidatif Stres* (Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005). Adana, 3-21.
- Apak, A.N.(2012). *Tahıllarda Spektrofotometrik Toplam Antioksidan Kapasite Tayini ve Antioksidan Bileşenlerin Kapiler Elektroforezle Saptanması* (Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012). 1-28.
- Apaydın, E. (2008). *Nar Suyu Konsantrelerinin Üretim Ve Depolama Sürecinde Antioksidan Aktivitedeki Değişimler* (Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008). Ankara, 1-3.
- Arıdurdu, R. ve Arabacı, G. (2013). Ciğertaze otu (*Salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17(2). 241-246.
- Arslan, N., (1998). *Türkiye de doğal çiçek soğanlarının potansiyeli ve geleceği*, I. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi Bildiriler Kitabı, Ekim, Yalova.
- Arslan, N., Gürbüz, B., Gümüşçü, A., İpek, A., Sarıhan, E. O., Özcan, S., ve Parmaksız, İ. (2004). *Sternbergia Candida Mathew et. Baytop Türünün Kültüre Alınması Üzerinde Araştırmalar*, 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.

- Gürbüz, B., Gümüşçü, A., İpek, A., Sarihan, E. O., Özcan, S., ve Parmaksız, İ. (2004). *Sternbergia Candida Mathew et. Baytop Türünün Kültüre Alınması Üzerinde Araştırmalar*, 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Avcı, G. (2013). Laktoferrinin Biyolojik Özellikleri ve Hastalıklarla İlişkisi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1). 23-34.
- Aydemir, B. ve Sarı, K. E. (2009). Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2(2). 56-60.
- Aydın, H. (2011). *Bazı Baharatların Farklı Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi* ( Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011). Edirne, 1-16.
- Bakır, C. (2010). *Anason (Pimpinella Anisum) ve Rezene (Foeniculum Vulgaris)'de Toplam Fenol/Flavonoid Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Metal İçeriği ile Değişiminin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010). Elazığ, 1-21.
- Bakkaloğlu, B. (2007). *Otistik Bozuklukta Antioksidan Enzim ve Antioksidan Vitamin Düzeyleri, Melondialdehit ve Glutasyon Düzeyleri* ( Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2007). Ankara, 24.
- Barthelmes, H. U., Niederberger, E., Roth, T., Schulte, K., Tang, W. C., Boege, F., and Marko, D. (2001). Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II $\beta$  poison and inhibits the growth of human tumour cells. *British journal of cancer*, 85(10), 1585.
- Baygar, T. (2010). *Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. Alkaloidlerinin Kimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010). İstanbul, 98.
- Baytop, T. (1984). Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün) (No. 40). *İstanbul Üniversitesi*.
- Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W., and Jungbauer, A., (2003). Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 84(2), 259-268.
- Berkov, S., Codina, C., and Bastida, J. (2012). The Genus Galanthus: a source of bioactive compounds. In *Phytochemicals-A global perspective of their role in nutrition and health*, InTechOpen.
- Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. (2009). Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(2), 1170-1176.
- Berkov, S., Ivanov, I., Georgiev, V., Codina, C., and Pavlov, A. (2014). Galanthamine biosynthesis in plant in vitro systems. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 643-650.
- Berkov, S., Pavlov, A., Ilieva, M., Burrus, M., Popov, S., and Stanilova, M. (2005). CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their in vitro cultures. *Phytochemical Analysis. An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16(2), 98-103.

- Berköz, M. ve Yalın, S. (2009). Normal ve Preeklampşik Gebelerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Aktivite, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 10(2), 53 – 58.
- Bogdanova, Y., Stoeva, T., Yanev, S., Pandova, B., Molle, E., Burrus, M., Stanilova, M. (2009). Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid biosynthesis during long-term in vitro cultivation of *Leucosium aestivum* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(4), 458-465.
- Boué, S. M., and Raina, A. K. (2003). Effects of plant flavonoids on fecundity, survival, and feeding of the Formosan subterranean termite. *Journal of chemical ecology*, 29(11), 2575-2584.
- Boyalı, E.(2009). *E Vitamini Uygulamasının Akut Taekwondo Egzersizinde Lipid Peksidasyonu, Antioksidan Enzimler ve Laktat Düzeylerine Etkileri* (Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009). Konya, 1-22.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activit, *LWT—Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Çetinkaya, S. (2013). *Bazı Bitkisel Fenolik Asitlerin İn Vitro Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi* ( Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013). Sivas, 4-17.
- Çiçek, D. (2010). *Sternbergia sicula Tineo ex Guss. Bitkisinden Kalite Kontrol Açısından Değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010). İzmir, 87-89.
- Çiçek, E., Çetin, B., Özbayram, A.K. ve Türkyılmaz, H. (2013). Kurutma, Çimlendirme Sıcaklığı ve Saklamanın Göl Soğanı (*Leucosium aestivum* L.) Tohumlarının Çimlenmesine Etkisi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 14(2), 245-252.
- AYDIN, Ç., ERMİŞ, A., and MAMMADOV, R. (2015). Phenolic Contents and Antioxidant Properties of *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel Ethanol Extract. *International Journal of Secondary Metabolite*, 2, 50-58.
- Daş, A. (2009). *Enzootik Pneumonili Besi Kuzularında Tedaviye Selenyum ve Vitamin E Eklenmesinin Total Oksidan ile Antioksidan Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması* ( Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009). Şanlıurfa, 8-20.
- Davis, L.C., Feldkamp, L. A. and Kress, J. W. (1984). Practical cone-beam algorithm. *JOSA A*, 1(6), 612-619.
- Davis, P. H., and Tan, K., (1988). *Flora of Turkey and the Aegean islands*. Edinburgh University Press.
- Decker, E. A., and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 38(3), 674-677.
- Demir, A. (2011). *Siyah ve Yeşil Çay İle Atıklarının Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011). Rize, 1-45.
- Derviş, E. (2011). Oral Antioksidanlar. *Dermatoloji Kliniği Dermatöz SB. Haseki Eğitim Hastanesi*, 2(1), 263-267.



- Devrim, E. (2005). *Yüksek Kolesterolü Diyetin Ratlarda Değişik Organlardaki Oksidan / Antioksidan Dengesine Etkisi ve Antioksidan Vitaminlerin Olası Rollerinin Araştırılması* (Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2005). Ankara, 17.
- Diop, M. F., Hehn, A., Ptak, A., Chrétien, F., Doerper, S., Gontier, E., and Laurain-Mattar, D. (2007). Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L. relationships to galanthamine content. *Phytochemistry reviews*, 6(1), 137-141.
- Dixit, R. B., Patel, T. S., Vanparia, S. F., Kunjadiya, A. P., Keharia, H. R., and Dixit, B. C. (2011). DNA-binding interaction studies of MİKrowave assisted synthesized sulfonamide substituted 8-hydroxyquinoline derivatives. *Scientia pharmaceutica*, 79(2), 293.
- Doğan, M. (2007). *Marketlerde ve Attarlarda Satılan Balların Antioksidan ve Oksidan Kapasitelerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007). Şanlıurfa, 42-50.
- Doğanay, S. (2014). *Akut Yorucu Egzersiz Yaptırılan Ratlarda Kan ve Karaciğer Oksidan /Antioksidan Sistemler Üzerine Bilberry'nin (Yaban Mersini) Etkileri* (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014 ). Erzurum, 18-62.
- Dursun, İ. (2001). *Butomus umbellatus. L ve Sparganium emersum Rehmann Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayini ve Fenolik Asit İçeriklerinin Hplc-Uv İle Analizi* (Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001). Kars, 3-75.
- Ekici, N.,and Dane, F. (2008). Cytological and histological studies on female gametophyte of *Leucojum aestivum* (Amaryllidaceae). *Biologia*, 63(1), 67-72.
- Ekici, N. (2006). *Leucojum Aestivum L.'Da Sitolojik ve Sitoembriyolojik Çalışmalar* ( Doktora Tezi , Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, 2006). Edirne, 1-14.
- Eruçar, S. (2006). *Bazı Bitkisel Çayların Fenolik Madde Profili ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006), İstanbul, 3-23.
- Fani, M. M., and Kohanteb, J. (2019). Inhibitory activity of Cinnamomum zeylanicum and eucalyptus globulus oils on Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, and Candida species isolated from patients with oral infections. *Journal of Dentistry*, 11, 14-22.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D.(1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412.
- Fritz, K.L., Seppanen, C.M., Kurzer, M.S.and Csallany, S. (2003). The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. *Nutrition Research*, 23, 479-487.
- Georgievaa, L., Berkov, S., Kondakova, V., Bastida, J., Viladomat, F., Atanassov, A., and Codina, C. (2007). Alkaloid variability in *Leucojum aestivum* from wild populations'', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(9-10), 627-635.
- Georgiev, V., Berkov, S., Georgiev, M., Burrus, M., Codina, C., Bastida, J., and Pavlov, A. (2009). Optimized nutrient medium for galanthamine production in *Leucojum aestivum* L. in vitro shoot system. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(3-4), 219-224.
- Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S., Ilieva, M., Georgiev, M., Gocheva, T., and Pavlov, A. (2012). Galanthamine production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections. *Engineering in Life Sciences*, 12(5), 534-543.

- Gökçe, M. (2009). *Muğla Yöresinde Yetiştirilen Bazı Zeytin Meyvelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması ve Sızma Zeytin Yağlarının Aromasının Kimyasal Analizi* (Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009). Muğla, 14-27.
- Görgü, N. (2011). *Tavşan Böbrek Dokusunda ESWL ile İndüklenen Oksidatif Hasar Üzerine Antioksidan (Taurin) ve Ozon Terapi Etkilerinin Biyokimyasal ve Histomorfometrik Karşılaştırılması* (Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2011). Kırıkkale, 17-27.
- Gümüştaş, M.K. (2008). Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi. *Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi*, 62, 329-340.
- Harşit, B. (2015). *Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Halk Arasında Tıbbi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015). Artvin, 12-31.
- Iannello, C. (2014). Pharmacological screening and biotechnological production of alkaloids from tissues and cells cultured by plants of the Amaryllidaceae family (Doctoral dissertation, alma , 2014). 9-19.
- İşbilir, S.Ş. (2008). *Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi* (Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008). Edirne, 4-32.
- Kalaycı, H. (2009). *Erken Doğum Eyleminde Total Oksidan Seviye, Total Antioksidan Kapasite Ve Oksidatif Stres indeksi* (Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2009). Gaziantep, 34-41.
- Kanbur, H. (2012). *Teucrium Chamaedrys L. ve Achillea Biebersteinii Afan. Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin Mukayesesi* (Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012). Erzincan, 1-40.
- Karakoyun, Ç. (2018). *Muğla İli Çevresinde Yetişen Narcissus Tazetta L. subsp. Tazetta l.Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar* ((Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018). İzmir, 267.
- Karaoğul, E. (2011). *Bazı Meşe (Quercus) Türü Köklerinin Ekstraksiyonu ve HPLC İle Karakterizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011). Kahramanmaraş, 31-41.
- Karuncula, C. (2013). *Leucojum Aestivum L. Bitkisinden Alkaloidlerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013). Edirne, 3-8.
- Kavas, Ö.G. (1994). Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fizyopatolojik Yaklaşım. *The Journal of the Faculty Of Medicine*. 47, 579-592.
- Keser, G. (2005). *Nasturtium Officinale R. Br.'De Kurşunun Strese Bağlı Enzimlerin Aktivitelerine, Gelişmeye, Mineral ve Klorofil İçeriğine Etkileri* (Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005). Adana, 10-18.

- Kıral, M. (2012). *Turnike Uygulanan Ortopedi Hastalarında İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif Hasara Karşı C ve E Vitamininin Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması* (Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2012). Ankara, 1-30.
- Koca, N., Soyer, Y. ve Karadeniz, F. (2003). Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 629-636.
- Koyuncu, M. ve ALP, Ş. (2014). New geophyte taxa described from Turkey at last decade. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(1), 101-110.
- Koyuncu, M, Şener, B. Temizer, H.ve Bingöl F.(1994). *Leucojum aestivum* bitkisinin alkaloitleri üzerinde araştırmalar. *8.bitkisel ilaç hammaddeleeri toplantısı bildiri kitabı*. 227-232.
- Kuş, B. (2012). *Altınotu Ve Ökseotu Bitki Ekstrelerinin Alabalık Filetosu Üzerindeki Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012). Adana, 1-10.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 56(6), 296-301.
- Mortaş, M. (2012). *Sakki Elması (Malus Communis L.)'nın Meyve ve Çekirdek Kısımlarının Antioksidan Aktivitelerinin Mukayesesi* (Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012). Erzincan, 1-35.
- Nakaç, A. (2010). *Futbolcularda E Vitamini Kullanımının Oksidan ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi* (Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010). Kayseri, 1-16.
- Nestel, P. (2003). Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. *Current opinion in lipidology*, 14(1), 3-8.
- Nordberg, J. and Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Odabas, M. S., ve Ayan, A. K. (2005). Leaf area prediction model for summer snowflake (*Leucojum aestivum* L.). *International Journal of Botany*, 1(1),12-14.
- Oğuz, A. (2008). *Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri* (Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008). Tokat, 1-45.
- Oraiza, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz. M. ve Deniz. İ. (2013). Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13 (1), 48-59.
- Orhan, N. (2011). *Prostat Kanseri Hastalarında Oksidan-Antioksidan Durum ve Paraoksonazın Bu Duruma Etkisinin Araştırılması* (Doktora Tezi, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2011). Düzce, 1-15.
- Önmez, H. (2007). *Papaver Somniferum Bitkisinden Elde Edilen Alkaloidlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözücü ve Metodların Karşılaştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007). Konya, 29-71.

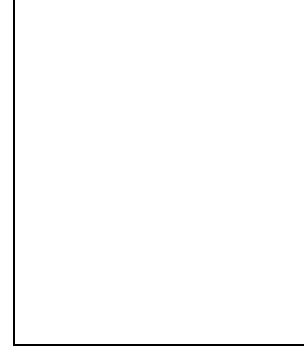
- Özel, K.G.S. ve Birdane, Y.O. (2014). Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 7(2), 41-52.
- Özenç, B. (2011). *Fumaria officinalis*'in Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011). Konya, 1-55.
- Ozmen, I., Çelikoğlu, U., ve Yazıcı, S.O.(2011, 8-10 Kasım). *Effects Of Ankyropetalum reuteri Fenzl Extract on Plasmid DNA*, 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium, Isparta.
- Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Heo, B. G., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., and Gorinstein, S. (2008). Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits. *Food Chemistry*, 107(2), 640-648.
- Paşaoğlu, O.M. (2011). *L-Name Uygulanan Sıçan Dokularında Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Propolisin Etkilerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011). Niğde, 5-6.
- Pehlivan, E.C. ve Uzun. H.İ. (2015). Shiraz Üzüm Çeşidinde Salkım Seyreltmesinin Verim ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri. *Yyü Tar Bil Derg*, 25(2), 119-126.
- Ptak, A., Tahchy, A., Skrzypek, E., Wójtowicz, T., and Laurain-Mattar, D. (2013). Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Open Life Sciences*, 8(6), 591-599.
- Sapcı, B. (2012). *Pamuk Saplarından Antioksidan ve Ksilitol Üretimi* (Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 2012). Tokat, 24-34.
- Seyidoğlu, N. (2011). *Leucojum aestivum* L'nin Parçacık Tekniği ile Üretimi. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 11(169) 7-11.
- Schumann, A., Berkov, S., Claus, D., Gerth, A., Bastida, J., and Codina, C. (2012). Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(7), 1907-1920.
- Slinkard, K., and Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.
- Stoyanova, M., Georgieva, L., Moncheva, P., and Bogatzevska, N. (2013). *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas marginalis* pathogens of *Leucojum aestivum*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(5), 4069-4073.
- Şahin, M. (2010). *Sideritis Libanotica Labill. Ssp. Linearis (Bentham) Bornm'in Metanol Ekstraktının Antioksidan Etkilerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010). Elazığ, 1-21.
- Şensoy, N. D. (2007). *Adaçayı ( Salvia Officinalis ) Yapraklarından Süperkritik Karbon Dioksit Ekstraksiyonu ile Doğal Antioksidan Eldesi ve Tayini* (Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007). Ankara, 1-50.
- Şimşekli, N. K. (2010). *Aspir (Carthamus tinctorius L.) Tohumlarından Ham Yağ Ekstraksiyonu İçin Sokselet Ekstraksiyonuna Alternatif Hızlı Bir Metodun Optimizasyonu: Ultrason Destekli Ekstraksiyon* (Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010). Kahramanmaraş, 1-12.

- Tanker, N., Koyuncu, M., ve Coşkun, M. (1998). *Farmasötik botanik*. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları, (78).
- Tazeoğlu, F. (2011). *Erzincan kirazı (Cerasus erzincanica; Ş. Yıldırım) Sap ve Tohum Kısımlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011). Erzincan, 1-34.
- Tekkeş, Y. (2006). *Streptozotosin İle Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006). Kahramanmaraş, 1-48.
- Teoh, H. L. and Heinrich, M. (2004). Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of ethnopharmacology*, 92(2), 147-162.
- Teuscher, C., Hickey, W. F., and Korngold, R. (1990). An analysis of the role of tumor necrosis factor in the phenotypic expression of actively induced experimental allergic orchitis and experimental allergic encephalomyelitis. *Clinical immunology and immunopathology*, 54(3), 442-453.
- Vaca, C. E., Wilhelm, J. and Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(2), 137-149.
- Yılmaz, G., Pirinççi, B., ve Erdoğan, M. (2005). DNA' nın topolojisi ve geometrisi. *Hasan Ali Yücel Eğitim Fakültesi Dergisi*, 3 , 11-22.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Dilber ÖZGÜN HÜNDÜR  
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti  
Doğum tarihi ve yeri : 06.08.1983- İstanbul  
Medeni hali : Evli  
e-posta : [dilber\\_ozgun@hotmail.com](mailto:dilber_ozgun@hotmail.com)



### Eğitim Derecesi

### Okul/Program

### Mezuniyet Yılı

Lisans	19 Mayıs Üniversitesi/Biyoloji	2010
Yüksek Lisans	Amasya Üniversitesi/Biyoloji	2019

### Yabancı Dili

İngilizce

### Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1. Hundur, D. O., Idil, O., Kandemir, N., Gul, M., & Konar, V. (2018). Phytochemical Screening and In-Vitro Antioxidant, Antimicrobial Activity and DNA Interaction of *Leucjum aestivum*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(10): 6704-6710