T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAKARCA*(Ornithogalum umbellatum)* BİTKİSİNİN FARKLI DOKULARINA AİT ÖZÜTLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

EDA YILMAZ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. HÜSEYİN AVNİ UYDU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RİZE-2019

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAKARCA*(Ornithogalum umbellatum)* BİTKİSİNİN FARKLI DOKULARINA AİT ÖZÜTLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU danışmanlığında, Eda YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 08/07/2019 tarihinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Prof. Dr. Hüseyin Avni Uydu

Üye : Doç. Dr. Nimet BALTAŞ

Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“Sakarca *(Ornithogalum umbellatum)* Bitkisinin Farklı Dokularına Ait Özütlerin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Lisansüstü eğitim sürecimin başından itibaren attığım tüm adımlarda bilgi, tecrübe ve her türlü manevi desteğini esirgemeyen başta değerli danışmanım Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU’ya, buradaki ailemin en değerli üyesi olan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehtap ATAK’a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. İhtiyaç duyduğum her anımda yardımıma koşan hocam Öğr. Gör. Sibel KARAKAŞ ve Arş. Gör. Esra PINARBAŞ’a, benim için oldukça zorlu başlayan bu süreçte manevi desteklerini ve gülen yüzlerini her zaman hissettiğim ablalarım Öğr. Gör. Erva RAKICI, Arş. Gör. Zehra TOPAL SUZAN ve Öğr. Gör. Nebahat EJDER’e çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi manevi desteklerini doğduğum günden bugüne bana her zaman hissettiren başta canım babam olmak üzere tüm aileme ve bugün olduğu gibi yarınlarımda da her adımımda desteğim olacağına inandığım nişanlım Bedri KUTLU’ya sonsuz teşekkürler.

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi RTEÜ-BAP birimi tarafından TSA-2018-931 kodlu proje ile desteklenmiştir.

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan SAKARCA *(Ornithogalum umbellatum)* BİTKİSİNİN FARKLI DOKULARINA AİT ÖZÜTLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 12/07/2019

Eda YILMAZ

Uyarı: *Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 Sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

SAKARCA *(Ornithogalum umbellatum)* BİTKİSİNİN FARKLI DOKULARINA AİT ÖZÜTLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Eda YILMAZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya AnaBilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Organizmada gerçekleşen çeşitli kimyasal süreçler sonucu oluşan serbest radikaller biyomoleküllerle reaksiyona girerek, yaşlanma, kalp damar hastalıkları, diyabet, çeşitli kanser türleri ve sinir sistemi hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olabilirler. Antioksidanlar, serbest radikallerin hücrelere zarar vermelerini onlar ile etkileşime girerek önlerler. Doğal antioksidanlar vücuda bitkiler aracılığında diyetle alınır. Ortalama yaşam süresinin uzun olduğu illerden biri olan Giresun'da yöresel mutfakların en önemli elemanı otsu bitkilerdir. Bu doğrultuda tez çalışmasının amacı Ordu-Giresun yöresinde yaygın olarak tüketilen bitkilerin başında gelen, halk arasında Sakarca adı verilen *Ornithogalum umbellatum* bitkisinin farklı dokularından elde edilen özütlerinin toplam fenolik içeriğinin ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesidir. Çalışmada kullanılan bitkiler Giresun ili Bulancak ilçesinden temin edilmiştir. Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, FRAP aktivitesi, CUPRAC aktivitesi, DPPH radikali temizleme aktivitesi ve özütlerin H_2O_2 ile stres oluşturulan eritrosit hücrelerindeki etkisi; lipit peroksidasyonunu engeleme kapasitesi, toplam tiyol (-SH) düzeyleri, eritrosit hücre zarlarında protein oksidasyonu belirteci olan protein karbonil miktarları belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, CUPRAC aktivitesi en yüksek yaprak özütünde, lipit peroksidasyonu engelleme kapasitesi en yüksek yaprak özütünün bulunduğu çalışma ortamında görülmüştür. FRAP aktivitesi, DPPH radikali temizleme aktivitesi en yüksek çiçek özütünde, protein karbonil oluşumu en yüksek çiçek özütünün bulunduğu çalışma ortamında tespit edilmiştir. Toplam tiyol düzeyi en fazla soğan özütünün bulunduğu çalışma ortamında görülmüştür. Bu sonuçlara göre bitkinin özellikle yaprak ve çiçek kısımlarının belli düzeylerde antioksidan etkiye sahip oldukları ve hücresel ortamda bu etkinliklerini korudukları dolayısıyla hücre harabiyeti ve yaşlanmasında Sakarcanın engelleyici etkisi olabileceği söylenebilir.

2019, 75 sayfa

Anahtar Kelimeler : Sakarca, *Ornithogalum umbellatum*, serbest radikal, antioksidan kapasite

ABSTRACT

INVESTIGATION of ANTİOXİDANT PROPERTİES of EXTRACTS FROM DİFFERENT TİSSUES of *Ornithogalum umbellatum*'s

Eda YILMAZ

Recep Tayyip Erdoğan University

Graduate School of Health Sciences

Deperment of Medical Biochemistry

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Free radicals formed by various biochemical process in the organism can react with biomolecules and cause aging, cardiovascular diseases, diabetes, various types of cancer and nervous system diseases. Antioxidants prevent free radicals from damaging cells by interacting with them. Natural antioxidants are taken to the body through plants through diet. The most important element of the local cuisine is the herbaceous plants in Giresun, which is one of the provinces where the average life span is long. The aim of this thesis is to determine the total phenolic content and antioxidant properties of the extracts obtained from different tissues of *Ornithogalum umbellatum* called Sakarca, which is one of the most commonly consumed plants in Ordu-Giresun region. Plants used in the study were obtained from Bulancak district of Giresun province. Total phenolic content of plant extracts, total flavonoid content, FRAP activity, CUPRAC activity, DPPH radical scavenging activity and the effect on extracts on H_2O_2-induced erythrocyte cells; inhibition of lipid peroxidation capacity, total thiol (-SH) levels, protein carbonyl levels, of protein oxidation markers in the erythrocyte cell membranes were determined. Total phenolic content, total flavonoid amount, CUPRAC activity was found in the highest leaf extract, lipid peroxidation was found in the working environment with the highest leaf extract capacity. FRAP activity, DPPH radical scavenging activity and the highest flower extract, protein carbonyl formation was found in the study environment where the highest flower extract. The total thiol level was highest in the onion extract. These results indicate that leaf and flower tissues of the plant have some levels of antioxidant effect and maintain these activities in cellular environment. Therefore, it can be said that Sakarca plant may have inhibitory effect on cell destruction and aging.

2019, 75 pages

Key Words : Sakarca, *Ornithogalum umbellatum*, free radical, antioxidant capacity

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ……I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ……II
ÖZET……III
ABSTRACT ……IV
İÇİNDEKİLER……V
ŞEKİLLER DİZİNİ……VIII
TABLOLAR DİZİNİ……IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ……X
1. GENEL BİLGİLER……1
1.1. Giriş……1
1 1.2. Serbest Radikaller……2
1.2.1. Kovalent bağların homolitik kırılması……3
1.2.2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi……3
1.2.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi……4
1.2.4. Serbest Oksijen Radikalleri……5
1.2.4.1. Singlet oksijen……6
1.2.4.2. Süperoksit radikali……6
1.2.4.3. Hidrojen peroksit……7
1.2.4.4. Hidroksil radikali……7
1.2.4.5. Perhidroksil radikali……8
1.2.5. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri……9
1.2.5.1. Lipit peroksidasyonu……10
1.2.5.2. Protein oksidasyonu……11
1.2.6. Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri……12
1.3. Antioksidanlar……13
1.3.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar……15
1.3.1.1. Endojen kaynaklı enzimatik antioksidanlar……15
1.3.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar……16
1.3.2. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar……18
1.3.2.1. Bitkisel antioksidanlar……20
1.4. Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) Bitkisinin Özellikleri……24
1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri……25

1.5.1. Toplam fenolik madde tayini…….....26
1.5.2. Bakır (II) indirgenme antioksidan kapasitesi yöntemi (CUPRAC…….…...26
1.5.3. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)…….....27
1.5.4. DPPH radikali temizleme aktivitesi yöntemi……...…….28
1.6. Eritrosit ve Oksidatif Stres……...……...……....28
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR……...……...……....29
2.1. Kullanılan Cihazlar……...……...……...29
2.2.Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar……...……...…….....29
2.3. *Ornithogalum umbellatum* ‘un Toplanması…….....34
2.4. *Ornithogalum umbellatum* Özütlerinin Hazırlanması……...34
2.5. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi…….....35
2.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi……..36
2.7. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini…….....37
2.8. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini……....38
2.9. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi…….....39
2.10. Lipit Peroksidasyonunu Engelleme Kapasitesinin Belirlenmesi…….....40
2.10.1.Eritrosit paketinin hazırlanması……40
2.10.2.Hücre süspansiyonlarının hazırlanması.....40
2.10.3. MDA miktar tayini……...41
2.11. Toplam Tiyol (-SH) Düzeylerinin Belirlenmesi…….....41
2.12. Protein Oksidasyonunu Baskılama Kapasitesinin Belirlenmesi…….....42
2.12.1. Eritrosit hücre zarı eldesi…….....43
2.12.2. Eritrosit hücre zarı protein miktarının belirlenmesi…….....43
2.12.3. Eritrosit hücre zarı protein karbonil miktarının belirlenmesi……...44
2.13. İstatistiksel Analiz.....45
3. BULGULAR……..…46
3.1. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin Toplam Fenolik Madde İçerikleri…….....46
3.2. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin Toplam Flavonoid (TF) Madde İçerikleri…….....47
3.3. Bitki Özütlerinin FRAP Analizi……....48
3.4. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerinin CUPRAC Analizi……....50
3.5. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi…….....51
3.6. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin Lipit Peroksidasyonunu Engelleme Kapasitesi….....52
3.7. Bitki Özütlerinin Toplam Tiyol (-SH) Düzeyleri…….....54

3.8. Protein Oksidasyon Ürünü Olarak Eritrosit Ghost Protein Karbonil Miktarları……...56
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR……....58
5.ÖNERİLER……...65
KAYNAKLAR…….66
EKLER.....73
ÖZGEÇMİŞ.....75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi……..…..3
Şekil 2. Glutatyonun yapısı…….....17
Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı……...17
Şekil 4. Ürik asidin kimyasal yapısı……...….18
Şekil 5. A vitamininin kimyasal yapısı……....19
Şekil 6. C vitamininin kimyasal yapısı…….....20
Şekil 7. E vitamininin kimyasal yapısı……....20
Şekil 8. Flavonoidlerin temel yapısı…….22
Şekil 9. Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları…….....23
Şekil 10. Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi……....27
Şekil 11. Fe^{+3}'ün Fe^{+2}'ye indirgenmesi……....27
Şekil 12. DPPH radikalinin molekül yapısı……....28
Şekil 13. Gallik asit kalibrasyon grafiği…….....35
Şekil 14. Kuersetin kalibrasyon grafiği……...…36
Şekil 15. Troloks kalibrasyon grafiği……...38
Şekil 16. Troloks kalibrasyon grafiği……...39
Şekil 17. MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon……...41
Şekil 18. İndirgenmiş glutatyon kalibrasyon grafiği……...42
Şekil 19. BSA kalibrasyon grafiği……...…44
Şekil 20. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam fenolik madde miktarı……..…...47
Şekil 21. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam flavonoid madde miktarı……..…...48
Şekil 22. Sakarca bitkisine ait özütlerin FRAP aktivitesi……...…49
Şekil 23. Sakarca bitkisine ait özütlerin CUPRAC aktivitesi…….....51
Şekil 24. Özütlerin DPPH radikali temizleme kapasiteleri…….....52
Şekil 25. Sakarca bitkisine ait özütlerin MDA düzeyleri……...….54
Şekil 26. Eritrositlerdeki toplam –SH miktarlarının grafiksel gösterimi……..…..55
Şekil 27. Eritrosit ghost protein karbonil miktarının grafiksel gösterimi……..….57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen ve reaktif azot türleri……..…4
Tablo 2. Serbest radikal kaynakları……...…5
Tablo 3. Endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması…….....14
Tablo 4. Kullanılan cihazlar……....29
Tablo 5. Kullanılan kimyasallar maddeler…….....30
Tablo 6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları…….....31
Tablo 7. Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için pipetleme hacimleri……....35
Tablo 8. Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için pipetleme miktarları……....37
Tablo 9. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam fenolik madde miktarı…….....46
Tablo 10. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam flavonoid madde miktarı.....47
Tablo 11. Sakarca bitkisine ait özütlerin FRAP aktivitesi.....49
Tablo 12. Sakarca bitkisini farklı kısımlarına ait CURPAC aktivitesi.....50
Tablo 13. Özütlerin DPPH radikal temizleme aktivitesinin SC_{50} değerleri.....51
Tablo 14. Sakarca bitkisine ait özütlerin MDA düzeyleri.....53
Tablo 15. Eritrositlerdeki toplam –SH miktarları.....55
Tablo 16. Eritrosit Ghost protein karbonil.....56

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
ÇDYA	: Çoklu doymamış yağ asidi
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)
Fe	: Demir
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Kuvveti
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
GST	: Glutatyon-S-transferaz
HOCl	: Hipoklorik asit
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
$HO_2^{\cdot}$	: Perhidroksil radikali
IC_{50}	: % 50 İnhibisyon konsantrasyonu
M	: Molarite
MDA	: Malondialdehit
mmol	: Milimol
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normalite
NaCl	: Sodyum klorür
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
NADPH	: Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
Na_2HPO_4	: Sodyum Monohidrojen Fosfat

NaN_3	: Sodyum azid
NaOH	: Sodyum Hidroksit
$NO^{\cdot}$	: Nitrik Oksit
NO_2	: Azot Dioksit
$^1O_2$	: Singlet Oksijen
$O_2^{\cdot -}$	: Süperoksit Radikali
$OH^{\cdot -}$	: Hidroksil Radikali
ORAC	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PBS	: Tuzlu Fosfat Tamponu
pH	: Hidrojenin İyonu Aktivitesi
RBC	: Eritrosit
RNA	: Ribonükleik asit
RKT	: Reaktif Klor Türleri
RNT	: Reaktif Azot Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RST	: Reaktif Kükürt Türleri
SD	: Standart Sapma
TBA	: 2-Tiyobarbütirik asit
TBARS	: "Tiobarbutiric acide reaktive susbstance"
^oC	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
%	: Yüzde
•	: Radikal

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanlık tarihinin başından itibaren bitkiler; beslenme, barınma, savunma, ısınma ve tedavi gibi birçok değişik amaç doğrultusunda kullanılmaktadır. İnsanlarla bitkiler arasında yüz yıllara dayanan bu bağ, yapılan arkeoljik çalışmalarda elde edilen bulgularla desteklenmektedir. İnsanlar besin elde etmek ve sağlık problemlerine çözüm geliştirmek adına bitkilerden yararlanmışlardır (Koçyiğit, 2005). Dünya genelinde bitkiler ile insanlar arasındaki bu sıkı ilişkinin kanıtına dair ilk veriler olarak, Kuzey Irak Şanidar Mağarası'nda 1957-1961 yıllarında yapılan kazılarda bir şamana ait olduğu düşünülen mezarda, kanarya otu, civanperçemi, gül hatmi, mor sümbül, peygamber çiçeği ve efedra gibi bitki türlerinin bulunması kabul edilmektedir (Lewin, 2000). Anadolu'da ise Hattuşaş'ta bulunan Hitit tabletlerinde yer alan; mazı, hardal, meyan, sarımsak, üzerlik, adam otu , badem, söğüt ve zeytinin yazılı olduğu reçete örnekleri bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanılmasına yönelik en eski yazılı kayıtlar olarak ifade edilmektedir (Kan ve Arslan, 2001). Tedavi edici olarak kullanılan bitki türlerinin sayısı sürekli artış göstermektedir. Mezopotamya Uygarlığı döneminde bilinen tıbbi bitki türü sayısı 250 kadarken, Arap-Fars uygarlığı döneminde bu sayı 4.000 kadardı. Ondokuzuncu yüzyılın başlarında ise literatürlere geçen tıbbi amaçlı kullanılan bitki türü sayısı 13.000'e ulaşmıştır (Tan, 1992).

Türkiye coğrafi konumunun bir getirisi olarak güçlü bir tarımsal potansiyele ve bitki çeşitliliğine sahiptir. Gıda ve katkı maddeleri, kozmetik, parfümeri, bitki kimyasalları, bitkisel ilaç gibi pek çok sektöre temel oluşturan tıbbi ve aromatik bitkiler ülkemiz florasında bol miktarda bulunmaktadır (Bayram vd, 2010).

Gelişmekte olan teknoloji, çevre kirliliği, kimyasal maddeler, sanayi atıkları, UV ışınları, X-ışınları, sigara dumanı ve stres gibi faktörler vücutta serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır (Borek, 1987). Serbest radikallerin kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson gibi sinir sistemi hastalıkları, diyabet, katarakt, romatoit artrit gibi pek çok hastalıkta rol oynadığı ve yaşlanmaya neden olan en önemli faktör olduğu düşünülmektedir (Cross vd, 1987). Serbest radikallerin meydana getirebileceği hücre hasarları ve bunlara bağlı ortaya çıkan hastalıkların önüne geçmede vücuttaki antioksidan sistemler devreye girmektedir. Antioksidan maddeler serbest radikaller ile reaksiyona girerek, radikallerin meydana getirecekleri hasarı önlemede kilit rol oynamaktadırlar. Antioksidan savunma

sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkacak serbest radikal etkisini azaltmak için bitkisel kaynaklı doğal antioksidanların dışarıdan alınması gerekmektedir. Bitkilerin doğal antioksidan özellikleri, metabolizmalarında ikincil metabolit olarak meydana gelen fenolik maddelerden kaynaklanmaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar,1999).

Bitkilerde doğal olarak bulunan ve diyetle alınan antioksidanların hastalıkların tedavisinde ve hastalıklardan korunmadaki rolleri son yıllarda üzerinde önemle durulan çalışma konularındandır. Bu tez çalışmasının amacı Ordu-Giresun yöresinde sıklıkla tüketilen, halk arasında sağlık açısından yararlı olduğu kabul gören bitkilerden biri olan Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) bitkisinin içeriğindeki toplam fenolik madde ve flavonoid miktarlarını, çeşitli yöntemlerle antioksidan kapasitesini belirlemek ve oksidatif stresin oluşturulduğu hücresel ortamda Sakarca bitkisinin farklı kısımlarına ait özütlerin hücrede oluşturduğu etkiyi incelemektir. Yapılan literatür taramalarında Sakarca bitkisi ile ilgili FRAP ve CUPRAC aktiviteleri, hücresel oksidatif stres modeli üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından ve literatürde mevcut olan Sakarca bitkisinin TFMM, TFM ve DPPH radikal temizleme aktiviteleri çalışmalarının bitkinin tamamının ya da toprak üstü ve toprak altı kısımlarının özütleri ile yapıldığından bu tez çalışmasının özgünlük değeri olduğu düşünülmektedir.

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran molekül ya da atomlardır. Sahip oldukları bu ortaklanmamış elektrondan dolayı, serbest radikaller oldukça reaktif ve kararsızdır (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Lipit, protein ve DNA gibi birçok molekül ile etkileşime girerek hücre için zararlı hale gelirler (Valko vd, 2007). Serbest radikaller katyonik, anyonik ya da nötral özellikte olabilirler. Organizmada; redoks tepkimeleri, radyasyon ve ultraviyole ışığa maruz kalma, endüstriyel atıklar ve sigara dumanı gibi çevresel kirleticiler ve aşırı egzersiz serbest radikal üretimine sebep olabilir.

Reaktif oksijen (ROT), kükürt (RST), klor (RKT) ve azot (RNT) türlerinden kaynaklı olmak üzere sınıflandırılan serbest radikaller arasında biyolojik sistemler için en önemlisi oksijen kaynaklı serbest radikallerdir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). ROT ve RNT'nin bir bölümü son orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulundurmadığı için

radikalik özellik göstermemekte ancak, canlı organizmada serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilmektedir. Bu moleküller radikal olmayan ROT ve RNT türevleri olarak adlandırılırlar (Valko vd, 2007). Radikal ve radikal olmayan ROT ve RNT, Tablo 1'de verilmiştir.

Serbest radikaller başlıca 3 mekanizma ile oluşurlar (URL-1, 2019).

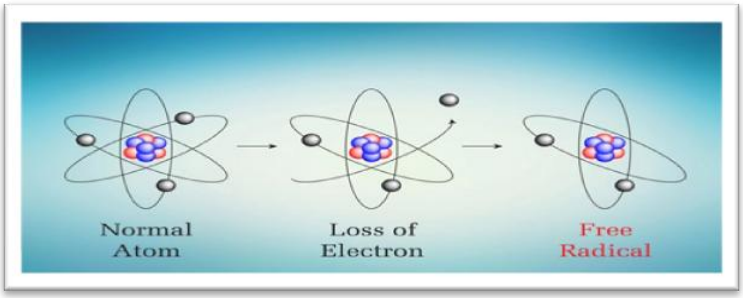
1.2.1. Kovalent bağların homolitik kırılması

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.

$$A{:}B \xrightarrow{\text{homoliz}} A^{\cdot} + B^{\cdot} \quad \text{radikaller}$$

1.2.2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi

Radikal özellik göstermeyen bir molekülden elektron kaybı sonucu dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi

1.2.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot}$$

Tablo1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen ve reaktif azot türleri.

Radikal Türleri	**Radikal Olmayan Türler**
Reaktif Oksijen Türleri(ROS)	**Radikal Olmayan Oksijen Türleri**
➢ Hidroksil($OH^{\cdot}$) ➢ Süperoksit($O_2^{\cdot}$) ➢ Peroksil($ROO^{\cdot}$) ➢ Alkoksil($RO^{\cdot}$) ➢ Hidroperoksil($HO_2^{\cdot}$) ➢ Lipit Peroksil($LOO^{\cdot}$)	➢ Hidrojen Peroksit(H_2O_2) ➢ Singlet Oksijen($^1O_2$) ➢ Ozon(O_3) ➢ Hipokloröz asit(HOCI) ➢ Hipobromöz asit(HOBr)
Reaktif Azot Türleri(RNS)	**Radikal Olmayan Azot Türleri**
➢ Nitrik oksit($NO^{\cdot}$) ➢ Azot dioksit($NO_2^{\cdot}$)	➢ Nitrik asit(HNO_2) ➢ Azotdioksit(NO_2) ➢ Peroksinitrit($NOOO^-$) ➢ Nitroksil katyonu(NO^+) ➢ Nitroksil anyonu(NO^-) ➢ Di azot tetroksid (N_2O_4) ➢ Di azot triksid (N_2O_3) ➢ Peroksinitrik asit (ONOOH) ➢ Nitronyum katyonu (NO_2^+) ➢ Nitril klorid (NO_2Cl) ➢ Alkil peroksinitrit (ROONO)

Serbest radikaller endojen ya da eksojen kaynaklı olarak meydana gelebilirler (Sinatra ve De Marco, 1995). Serbest radikal kaynakları tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Serbest radikal kaynakları.

Endojen Kanyaklar	Eksojen Kaynaklar
➢ Mitokondriyel elektron transport sistemi ➢ Fagositik hücreler(nötrofiller, makrofaj hücreleri, eozinofiler, endotel hücreleri) ➢ Lipit peroksidasyonu ➢ Ksantin oksidaz, mitokondriyel sitokrom oksidaz, galaktoz oksidaz, hemoglobin, flavoprotein, monoamin oksidaz, triptofandi oksigenaz gibi oksidan enzimler ve proteinler	➢ Parakuat, alloksan, dikuat gibi kimyasallar ➢ Parasetamol, karbon tetraklorür(CCl_4) gibi ilaç toksikasyonları ➢ UV, gama, mikrodalga ve X ışınları ➢ Orman yangınları, volkanik faaliyetler, sigara ve egzoz dumanı kaynaklı hava kirliliği ➢ Pestisit gibi fitokimyasallar

1.2.4. Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen, canlıların yaşamsal faaliyetlerinde ihtiyaç duydukları enerjinin üretimindeki rolü nedeniyle canlılar için oldukça önemlidir. Moleküler oksijen canlı için toksik etki göstermezken, enerji üretimi sırasında serbest oksijen radikali haline dönüşür. Yüksek miktarlara ulaştığındaysa hücrelere zarar verirler. Hücrelerde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijenin %90'ı mitokondride oksidatif fosforilasyon sırasında kullanılır.(Cankurtaran, 2005). Kullanılan oksijenin yaklaşık %3'ü kadarı ise mitokondrilerde ROS'a dönüştürülür (Muller vd, 2004).

Singlet oksijen radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, perhidroksil radikali serbest oksijen radikal türleridir.

1.2.4.1. Singlet oksijen

Biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları esnasında oluşan singlet oksijen ($^1O_2$), moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış halidir. İçerdiği yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönebilir ya da kovalent tepkimelere girer. Reaktivitesi ve karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksek olan singlet oksijenin yarılanma ömrü ise 10^{-6} ve 10^{-5} saniye arasındadır (Altınışık, 2000).

1.2.4.2. Süperoksit radikali

Moleküler oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) oksijen metabolizmasının ilk ara ürünüdür. Daha çok mitokondride solunum sırasında zincir reaksiyonlarından kaçan elektronların direk oksijen ile reaksiyona girmesiyle oluşan süperoksit radikali başka birçok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla meydana gelebilir (Fridovich, 1975). Hem grupları, Fe-S grupları ile ve prostatik grup olarak geçiş metalleri (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim gösterir.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$
$$Fe^{+2} + O_2 \rightarrow Fe^{+3} + O_2^{\bullet -}$$
$$Cu^{+1} + O_2 \rightarrow Cu^{+2} + O_2^{\bullet -}$$

Süperoksit radikali diğer radikallere kıyasla daha kararlı bir yapıya sahiptir ancak önemi vücutta hidrojen peroksit oluşumundan ve geçiş metallerinin indirgenmesinden sorumlu olmasıdır (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Süperoksit radikali düşük pH'da protonlanarak daha reaktif olan hidroperoksil radikalini oluşturur. Daha sonra bu radikalin süperoksit radikali ile birleşmesi sonucu oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.

Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle gerçekleşen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır. Süperoksit radikalinin yarılanma ömrü etkileşime girdiği enzimlere bağlı olarak değişmektedir (URL-2).

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ süperoksit radikali

$O_2^{\bullet -} + H_2O \rightarrow H O_2^{\bullet} + OH^-$ hidroperoksil radikali

$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ hidrojen peroksit radikali

1.2.4.3. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, $O_2^{\bullet -}$'ye bir elektron ilavesiyle ya da O_2'ye iki elektron eklenmesiyle de doğrudan meydana gelen radikal olmayan oksijen türlerindendir (Flora, 2007). Özel enzimlerle etkileşime girdiklerinden, yarılanma ömürleri bu enzimlere bağlı olarak değişiklik gösterir (URL-3).

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Hidrojen peroksit, nötrofillerin fagozomlarında bulunan bir enzim olan miyeloperoksidaz tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürüldüğü sırada geçiş metallerinin oksidasyonu yoluyla $OH^{\bullet}$ oluşmasına neden olduğundan ROS moleküllerinin üretilmesinde önemli bir aracı rol üstlenir. Hidrojen peroksidin bir diğer önemli fonksiyonu da biyolojik membranlara nüfus edebilmesi ve hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (Boots vd, 2008).

1.2.4.4. Hidroksil radikali

Hidroksil radikali, yarılanma ömrünün 10^{-9} saniye olmasından dolayı en aktif ve en toksik oksijen radikali olup birçok biyomolekül ile güçlü reaksiyona girerek biyolojik sistemlere diğer ROS'lardan daha fazla zarar verebilir (Valko vd, 2007). Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi hidrojen peroksitin Fe^{+2} ve Cu^+ veya diğer geçiş elementleri (Zn, Mn, Cr,

Co, Ni, Mo) varlığında indirgenmesiyle de oluşur. Bu reaksiyona fenton reaksiyonu denir. Geçiş metalleri böylelikle $OH^{\bullet -}$ oluşmasında önemli bir rol oynarlar (Kılınç ve Kılınç, 2002).

$$Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$$
$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\bullet -} + OH^-$$

Hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Haber-Weiss adı verilen bu reaksiyon bakır ve demir iyonları tarafından katalizlenir (Akkuş, 1995.)

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow OH^{\bullet} + H_2O + O_2$$

Hidroksil radikali, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparak yeni radikallerin oluşumuna neden olur.

$$R{-}SH + OH^{\bullet -} \rightarrow RS^{\bullet} + H_2$$
$$-CH_2- + OH^{\bullet -} \rightarrow -CH^{\bullet -} + H_2O$$

1.2.4.5. Perhidroksil radikali

Perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet}$), süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşur. Perhidroksil radikali, süperoksit radikalinden daha az polardır. Biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerek yağ asitlerine doğrudan etki edebilir ve lipit peroksitlerini meydana getirir (Aikens ve Dix, 1991).

$$O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$$

1.2.5. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Serbest radikaller miktarlarına bağlı olarak hem olumlu hem olumsuz yönde yaşamsal öneme sahiptirler. Enerji üretimi, elektron transferi gibi birçok metabolik faaliyetin temelini oluştururlar. Yüksek miktarlarda olduklarında ise lipitler, proteinler, karbohidratlar, zarlar ve nükleik asitler üzerinde zararlı etkilerinin oldukları bilinmektedir (Stefanis vd, 1997).

Oldukça reaktif moleküller olan serbest radikaller nötralize edilmediklerinde, yaşlanma, kanser, diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve iskemi gibi ciddi hasarlara yol açan hastalıklara neden olmaktadır (Lobo vd, 2010).

Hücre içi organellerin zarlarında yer alan lipitler, serbest radikal hasarına karşı oldukça hassastır. Serbest radikaller, lipitler ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna neden olurlar (Comporti, 1993). Lipit peroksidasyonu ile çok miktarda toksik yan ürün açığa çıkar ve bu yan ürünler ikinci haberciler gibi hareket ederek üretildiği yerden uzak bir alanda etkilerini gösterir. Lipit peroksidasyonuyla meydana gelen hasar, hücre fonksiyonları için son derece zararlıdır; hücre zar yapısı, geçirgenliği ve fonksiyonu bozularak zarlarda bulunan enzimler inaktif hale gelebilirler (Gutteridge, 1995).

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki etkileri amino asit içerikleri ve yerleşimine, hasarlı proteinin onarılabilirliğine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküller serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahip olduğu için triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitler içeren proteinler serbest radikallerle daha kolay etkileşirler. (Meram ve Aktaran, 2002). Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini engelleyerek birçok proteinin zarar görmesine yol açabilirler. ROT ve RNT'lerin neden olduğu protein oksidasyonu sonucunda, protein hidroperoksitler gibi kararlı ve oldukça reaktif ürünler oluşur. Bu ürünler ile geçiş metal iyonlarının etkileşimiyle radikaller meydana getirebilirler (Akkuş, 1995).

ROT ve RNT, hücrelerin genetik kodunu barındıran, hücrenin büyümesini sağlayan nükleik asitler (DNA) ile de etkileşime girerler. DNA bazlarının hidroksil gibi serbest radikallerle reaksiyona girmesi sonucu baz modifikasyonları meydana gelebilir (Hawkins ve Davies, 1998). DNA'da meydana gelen hasarlar tamir mekanizmalarıyla

onarılabilirler ancak bu mekanizmadaki yetersizlik sonucu hücrelerde fonksiyon kaybı, yaşlanma, mutasyon ve hücre ölümleri ortaya çıkabilir.

Serbest radikallerin karbohidratlarla da önemli etkileşimleri söz konusudur. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit ve okzoaldehitler gibi karbon merkezli radikaller meydana gelir (Akkuş, 1995). Meydana gelen bu radikaller, diyabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, çeşitli deri ve göz hastalıklarana yol açarlar. Okzoaldehitlerin DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilmeleri ve aralarında çapraz bağ oluşturabilmeleri onlara antimitotik özellik kazandırır. Dolayısıyla kanser ve yaşlanma gibi olaylarda rol üstlenirler (Yılmaz ve Ozan, 2003).

1.2.5.1. Lipit peroksidasyonu

Zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına lipit peroksidasyonu adı verilir ve reaksiyon sonucunda MDA, L-hidroksinonenal, lipit hidroperoksitleri gibi oldukça zararlı ve toksik etkiye sahip yan ürünler oluşur (Halifeoğlu vd, 2000). Lipit peroksidasyonu zar lipit yapısı, fonksiyonu ve geçirgenliğini bozarak hücrelere zarar verir.Lipit peroksidasyonu, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlediğinden zar yapısında meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür (Murray vd, 1996).

Lipit peroksidasyonu ; başlama, yayılma ve sonlanma olmak üzere üç ana basamakta gerçekleşir (Canoruç vd, 2001). Serbest radikallerin zardaki çoklu doymamış yağ asidi zincirinin α-metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile başlar. Uzaklaşan hidrojen atomundan dolayı yağ asidi zincirinin karbon atomu üzerinde ortaklanmamış bir elektron kalır ve zincir bir lipit radikali halini alır. Oluşan bu kararsız lipit radikali stabil hale gelebilmek için çift bağ pozisyonlarında değişiklik yaparak konjuge dien yapısına dönüşür. Ardından moleküler oksijen ile lipit radikalinin etkileşimi sonucu lipit peroksil radikali meydana gelir. Böylece lipit peroksidasyonunun ilk aşaması olan başlama safhası oluşur. Yayılma basamağında lipit peroksil radikali, zar yapısında yer alan diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirleri ile etkileşerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna neden olur ve kendi de meydana gelen hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşür. Bu olay zincirleme reaksiyonlar şeklinde devam ederek sonuçta kararsız hidroperoksil

radikallerinden MDA, L-hidroksinonenol gibi sitotoksik ürünler ile etan ve pentan gibi hidrokarbon gazları açığa çıkar. Ortamdaki moleküler oksijen ve antioksidan miktarına bağlı olarak lipit peroksidasyonu sonlanabilirken, singlet oksijen, hidrojen peroksit, bakır, demir gibi geçiş metal iyonları varlığındaysa hızlanabilir (Esterbauer vd, 1993).

- Başlama

  $RH + O_2^{\bullet -} \rightarrow R^{\bullet} + HOO^-$

  $RH \rightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet}$

- Yayılma

  $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$

  $ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$

- Sonlanma

  $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R - R$

  $ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$

RH : Çoklu doymamış yağ asidi

$R^{\bullet}$: Serbest radikal

$ROO^{\bullet}$: Peroksil radikali

ROOH : Hidroperoksit

$HOO^{\bullet -}$: Hidroperoksil radikali

Lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelen son ürünlerden biri olan MDA kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilmekte ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılmaktadır. MDA yüksek reaktiviteye sahip olup birçok biyomoleküle etki ederek kalıcı hasarlara yol açtığı gibi zar akışkanlığının azalmasına, zar fonksiyonlarının yavaşlamasına, zar reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına ve Ca^{+2} iyonlarının zardan geçişlerinin artmasına neden olur (Uchida, 2000). Dokularda artan MDA seviyesinin koroner arter hastalığı, akciğer kanseri ve diğer akciğer hastalıkları, DNA'ya bağlanarak mutasyonlar ve enflamasyona yol açtığı bilinmektedir (Uzun vd, 2000).

1.2.5.2.Protein oksidasyonu

Proteinlerin ROT ya da oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu meydana gelen kovalent modifikasyon protein oksidasyonu olarak adlandırılır. (Gülbahar 2007). Serbest radikallerin oksidan etkisiyle oluşan oksidatif protein modifikasyonu

sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi, enzim aktivitesinde azalma, yeni reaktif türlerin oluşumu (peroksit), hücre sinyal yollarında modifikasyon, proteinlerde fonksiyon kaybı ile hücre ve doku hasarına bağlı olarak katarakt, kronik böbrek yetmezliği, romatoid artrit, sepsis, Parkinson, Alzheimer gibi birçok patolojik durum ortaya çıkar (Dalle-Donne vd, 2003, Hawkins ve Davies 2001). Protein oksidasyonu ; protein karbonil oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol gruplarının (P-SH) kaybı, nitrotirozin (NT) oluşumu ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumu olmak üzere 4 temel mekanizma ile gerçekleşir (Dean vd,1997).

ROT amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının meydana gelmesine ve protein fragmentasyonuna sebep olur. Histidin, prolin, arjinin, ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ya da peptid omurgasında oluşan hasar sonucunda protein karbonil ürünleri ortaya çıkar. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. Protein karbonil düzeylerinin belirlenmesi, oksidatif protein hasarını ölçmede hassas bir yöntemdir (Evans vd, 1999).

1.2.6. Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri

Düşük yoğunluklarda oldukları sürece ROS ve RNS'nin yararlı etkilerinden söz edilebilir. Normal fizyolojik bir fonksiyon olarak birçok hücrede $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 ve NO üretimi olur. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin yararlı etkileri arasında fagositoz yoluyla enfeksiyonlara karşı savunma, yabancı maddelerin sitokrom p450 tarafından vücuttan uzaklaştırılması, sitotoksik lenfositler ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerinin yok edilmesi, mitokondride enerji üretimi ve hücre büyümesi sayılabilir. Ayrıca düşük yoğunluklarda bulunduklarında ROS ve RNS'nin çekirdekte hücresel transkripsiyon faktörlerinin uyarılması, intrasellüler depolardan kalsiyum salınımı, tirozin fosfatlanmasının uyarılması, bazı sitokinler ve büyüme faktörü sinyallerinin aktifleştirilmesi gibi hücresel sinyaller üzerine önemli rolleri bulunur. Bunların dışında ROS prostaglandin ve tiroksin gibi moleküllerin biyosentezinde uyarıcı olarak rol alır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Endotel hücreleri tarafından kullanılan NO lökosit adezyonu, damar düz kaslarının kan basıncını düzenlemesi, anjiogenesis, trombozişte gerekli olduğu için önemlidir.

Bunların dışında, nöronlar tarafından üretilen NO önemli bir transmitter maddedir. Makrofajlar tarafından üretilen NO ise immun yanıt oluşturmakta önemli bir arabulucudur. Hücredeki rollerinden ve yararlarından bahsedilen serbest radikallerin miktarı arttıkça zararlı etkileri ortaya çıkabilir (Fang vd, 2002).

1.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücreye zarar veren serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek ya da ortamdaki serbest radikallerle reaksiyona girerek etkisiz hale getiren ve yapısında genellikle fenolikler bulunduran moleküllerdir (Seven ve Candan, 1996). Vücutta adeta kalkan görevi gören antioksidanların özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir. Serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur ve bu dengenin radikaller lehine bozularak reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması durumuna oksidatif stres adı verilir (Akkuş, 1995). Oksidatif stres hücre hasarı hatta hücre ölümlerine neden olurken kanser gibi birçok hastalığın da tetikleyicisidir.

Antioksidanlar etki mekanizmalarına göre 4 grupta incelenirler.

- Giderici, toplayıcı, süpürücü (Scavenging) etki gösterenler; mevcut radikaller ile etkileşerek onları daha az zararlı hale getirirler ve yeni radikallerin oluşumunu önlerler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler etkilerini bu şekilde gösterirler.
- Bastırıcı (Quencher) etki gösterenler; oksidanlara bir hidrojen aktararak oksidan özelliklerini azaltır ya da inaktif hale getirirler. C ve E vitaminleri, ürik asit, β-karoten ve flavanoitler bu şekilde etki gösterirler.
- Zincir kırıcı (Chain break) etki gösterenler; zincirleme devam eden reaksiyonları belirli aşamalarda kırarak oksidatif gücü ortadan kaldırırlar. Hemoglobin, albümin, seruloplazmin ve mineraller antioksidan etkilerini bu şekilde gösterirler.

- Onarıcı (Repair) etki gösterenler; serbest radikallerden kaynaklanan hasarın onarımını sağlarlar. DNA onarım enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz antioksidan etkilerini bu şekilde gösterirler.

Antioksidanların, kaynaklarına göre endojen ve ekzojen antioksidanlar şeklinde sınıflandırılmaları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması

Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar	**Endojen Kaynaklı Antioksidanlar**
Doğal antioksidanlar	Enzimatik antioksidanlar
➢ Vitamin C	➢ Süperoksit dismutaz (SOD)
➢ Vitamin A	➢ Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
➢ Vitamin E	➢ Glutatyon S-transferaz (GST)
➢ Karotenoidler	➢ Katalaz (Cat)
➢ Polifenolik bileşikler	➢ Mitakondriyal sitokrom oksidaz sistemi
Sentetik antioksidanlar	➢ Hidroperoksidaz
➢ Bütile hidroksitoluen (BHT)	Enzimatik olmayan antioksidanlar
➢ Bütile hidroksianizol (BHA)	➢ Lipit fazda bulunanlar
➢ Gallik asit türevleri	α-tokoferol, β-karoten
➢ Sodyum benzoat	➢ Sıvı fazda bulunanlar (kan plazması ya da hücre sitozolünde)
➢ Propil galat	Melatonin, seruloplazmin, transferin, ferritin, bilirubin, glutatyon, ürat, albümin, metionin, hemoglobin

1.3.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar

1.3.1.1. Endojen kaynaklı enzimatik antioksidanlar

Süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene katalizleyen antioksidan enzim, Süperoksit Dismutaz (SOD)'dır. Reaktif oksijen türevlerine karşı savunmada; metabolik substrat olarak süperoksit radikallerini kullanarak onu daha az zararlı bir bileşik olan hidrojen perokside dönüştürmekle görevlidir (Sen vd, 2010).

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

Katalaz (CAT), her biri bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içeren, 60 kdal molekül ağırlığına sahip dört protein alt biriminden oluşan bir enzimdir. Hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalizler. Katalaz, karaciğer başta olmak üzere vücuttaki çeşitli doku ve organlarda bol miktarda, insan eritrositlerinde yüksek konsantrasyonda sitozolde çözünmüş şekilde bulunur (Hugo, 1983). Peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda yer alır.

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Katalaz lipit peroksitlerine etki edemediğinden, lipit peroksidasyonu başladığında lipit hidroperoksitler oluştuktan sonra katalazın antioksidan aktivite etkisinden söz edilememektedir.

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan sitozolik bir enzimdir. Her biri bir selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden meydana gelmiştir (Sen ve Chakraborty, 2011). GSH-Px özellikle eritrositlerdeki membran hasarında fosfolipitlerin korunmasında görevli en güçlü antioksidandır. GSH-Px hidrojen peroksidin suya indirgenmesini sağlarken hidroperoksitlerin de daha etkisiz bileşiklere dönüşümünü katalizler. Elektron kaynağı olarak glutatyonu kullanır.

Hidrojen peroksit, lipit hidroperoksitleri, DNA hidroperoksitleri enzimin substratıdır.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + 2H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + ROH + H_2O$$

GSH-Px lökositler için de önemlidir. Fagositik hücrelerde oksidatif yıkım sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda görevlidir (Costello ve Webber, 1990).

Molekül ağırlığı 104 kdal olup iki alt birimden oluşan Glutatyon Redüktaz (GR), okside glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizleyen enzimdir. Her alt birim merkezinde prostetik grup olarak bir FAD yer alır ve enzimin koenzimi NADP'dir. GR sitozolde ve mitokondrilerde yer alır.

$$GSSG + 2NADPH + 2H^+ \rightleftharpoons 2GSH + NADP^+$$

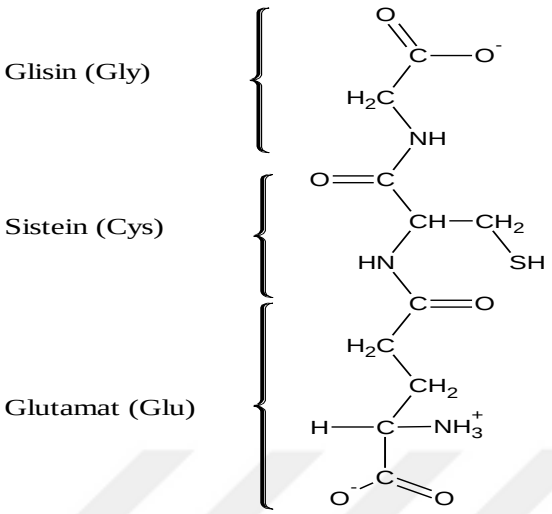
GSH hemen tüm hücrelerde en çok bulunan protein dışı tiyol olup hücre metabolizmasında, bazı bileşiklerin taşınmasında, hücre korunmasında görevlidir. Glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ile birlikte hücre içinde hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında görev alır (Efe, 1996).

Mitokondriyal sitokrom oksidaz, solunum zincirinin son basamağında rol oynayarak süperoksit radikalinin indirgenmesinden sorumlu bir antioksidan enzimdir (Miser, 2011).

1.3.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

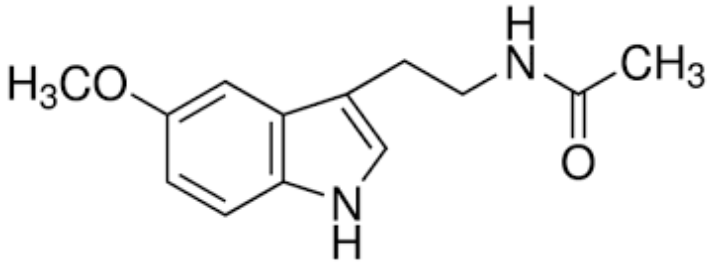
Glutatyon (GSH)**, t**üm ökaryötik hücrelerde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidanlara karşı koruyan, glutamik asit-sistein-glisinden oluşmuş bir tripeptitdir. Hücrelerdeki GSH'ın yaklaşık üçte biri disülfid şeklinde ve tiyol grubu bulunduran sistein, koenzim A gibi bileşiklerle birlikte bulunur. Şekil 2'de glutatyonun yapısı gösterilmiştir. GSH, gen ekspresyonunda, DNA sentezinde, hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, sinyalizasyonun düzenlenmesinde, zehirli maddelerin

detoksifikasyonunda ve serbest radikalleri indirgeyerek hücrelerin oksidatif hasarı karşı korunmasında görevlidir (Gözükara, 1997).



Şekil 2. Glutatyonun yapısı

Melatonin, hidroksil radikalini temizleyerek protein, lipit ve nükleik asitlerin oksidasyonunu önleyen güçlü bir antioksidandır. Bazı antioksidanlarda olduğu gibi her hangi bir prooksidan etkiye sahip değildir. Hücre çekirdeğine girerek DNA'yı oksidatif hasardan koruyor olması melatonine üstün bir özellik kazandırır. Yaşlanmaya bağlı olarak melatonin miktarında meydana gelen azalma yaşlanma sürecindeki hastalıklarda melatoninin etkisi olduğunu gösterir (Hevia vd., 2014). Melatoninin yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir.



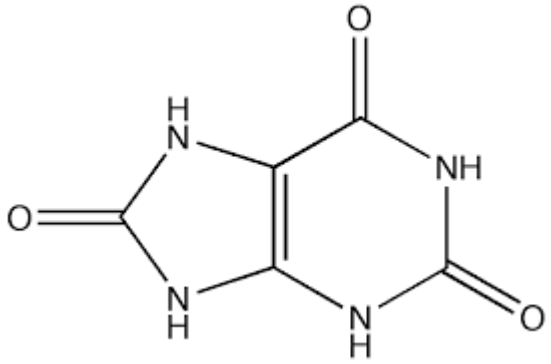
Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı

Seruloplazmin, kandaki Cu'ı geri dönüşümlü bir şekilde bağlayarak taşınmasını sağlayan seruloplazmin, hemen tüm dokularda bulunur. Ferro demiri(Fe^{+2}) feri demire (Fe^{+3}) yükseltger ve hidroksil radikali oluşumunu önlemiş olur (Chauhan vd, 2004).

Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikallerini temizleyen bilirubin, yaşlı eritrositlerin hemolizi ile hem proteinlerinin yıkımı sonucu meydana gelir (Burtis ve Ashwood, 2005).

Albümin, plazmadaki en etkili antioksidanlardan olduğu düşünülen albümin, lipit oksidasyon oluşumunu ve hipokloröz asitin (HOCl) oksidatif etkisini önlemekte görevlidir (Roche vd, 2008).

Ürik asit, insanda pürin metaboklizmasında ürat oksidaz enzimi bulunmadığı için son ürün olarak oluşan ürik asit birikir. Hidroksil, singlet oksijen, süperoksit, peroksinitrit anyonu ve peroksinitrik asitin temizleyicisidir. Sahip olduğu güçlü antiradikal etkisinin yanı sıra Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin şelatlanmasında rol oynadığı bilinmektedir (Kumar vd, 2015). Şekil 4'te ürik asidin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4. Ürik asidin kimyasal yapısı

1.3.2. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar

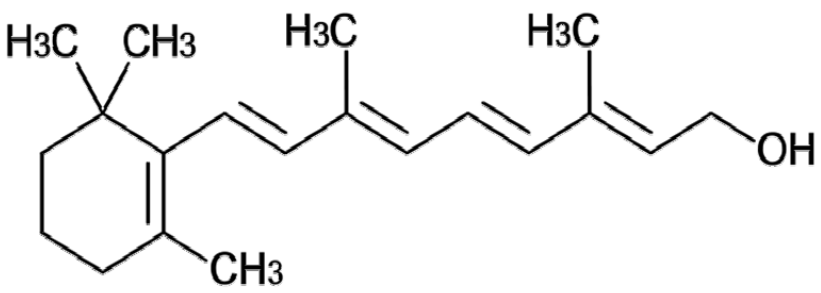
Eksojen antioksidanlar; A, C, E vitaminleri, ilaçlar, gıda antioksidanları ve bitkisel antioksidanlardır.

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlardan; ksantin oksidaz inhibitörleri; pürin metabolizmasında görev alan ve hipoksantinin ksantin ve ürik aside oksidasyonu sırasında süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikallerinin meydana gelmesine yol açan enzim olan ksantin oksidazın etkisini azaltırlar. NADPH oksidaz inhibitörleri; nötrofillerin plazma

zarında yer alan, oksijeni süperoksit anyonuna dönüştüren NADPH oksidaz enzimine etki ederek serbest radikal oluşumunu önlerler (Akkuş, 1995).

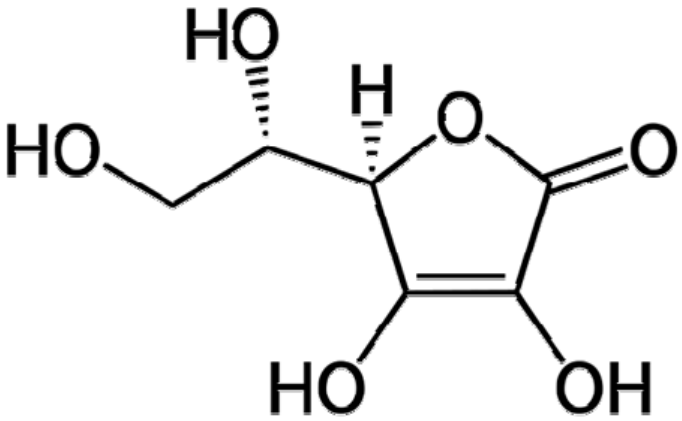
Gıdalardaki sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), sodyum benzoat, etoksikuin ve propilgallattır. Propigallat (PG) gallik asit esteri olup hidroksil radikallerinin vücuttan uzaklaştırılmasında, demir ve bakır katalizörlerini uzaklaştırarak oksidatif etkinin azaltılmasında görevli bir antioksidandır (Shahidi ve Naczk, 1995).

Yağda çözünen vitaminlerden, A vitamini (β-karoten) hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir. Şekil 5'te A vitamininin kimyasal yapısı verilmiştir.



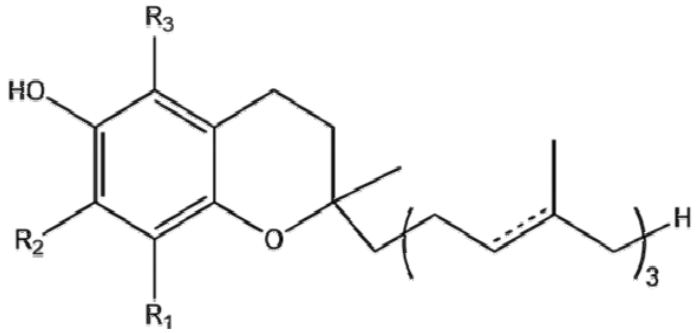
Şekil 5. A vitamininin kimyasal yapısı

Suda çözünen vitaminlerden olan C vitamini hücrede ekstraselüler ortamda bulunur ve önemli bir antioksidan ajandır. Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici olarak rol alır (Horton ve Fairhurst, 1987). Şekil 6'da C vitamininin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 6. C vitamininin kimyasal yapısı

E vitamini yağda çözünebilen ve bilinen sekiz izomeri olan zincir kırıcı özelliğe sahip önemli bir antioksidandır. Şekil 7'de E vitamininin kimyasal yapısı gösterilmiştir. İzomerleri arasında biyolojik aktivitesi ve antioksidan özelliği en güçlü olan α-tokoferol'dür. Hücre zarlarında yer alan E vitamini lipit peroksidasyonunu engelleyerek çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerden korunmasında görevlidir. Radikallerin yok edilmesi, zincir kırılması, baskılama, bozulan yapıların tamir edilmesi gibi antioksidan etki mekanizmalarının bir arada görülmesi E vitaminine güçlü antioksidan özelliği kazandırır (Dündar ve Aslan, 1999).



Şekil 7. E vitamininin kimyasal yapısı

1.3.2.1. Bitkisel antioksidanlar

Bitkiler (yağlı tohumlar, sebzeler, meyveler, tahıllar, baharatlar, çay), insanlık tarihinde gerek temel gıda olarak, gerek gıdalarda tat ve aroma arttırıcı olarak, gerekse

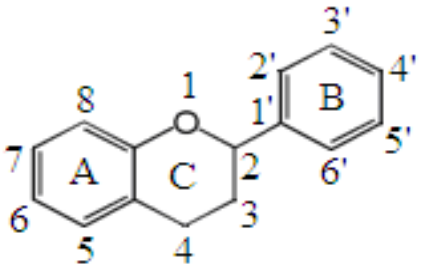
tedavi edici rolüyle hep var olmuştur. Antioksidan maddelerin özellikleri bilinmeye başladıktan sonra doğal antioksidan kaynağı olan bitkilerle ilgili yapılan araştırmalar da artmaya başlamıştır. Tedavi edici olarak bitkilerin kullanılması son yıllarda yaygınlaşmış olup bitkiler bu yönüyle birçok araştırmanın konusu olmaya devam etmektedir.

Bitkilerin antioksidan aktivitelerinin kaynağının içerdikleri flavonoidler, fenolik asitler ve karotenoidler olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Liu, 2004). Bitkiler tarafından karbohidrat, protein, lipit senzetinden sonra sekonder metabolizma ürünleri olarak sentezlenen bu maddeler serbest radikallere karşı koruyucu ajan olmalarının yanı sıra insektisit ve herbisit olarak görev yaparlar ve fitokimyasallar olarak adlandırılırlar.

Fenolik bileşikler ya da diğer adıyla polifenoller, aromatik benzen halkasına bağlı hidroksil grubu (-OH) içeren bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, serbest oksijen ve azot türlerinin hücrelerden uzaklaştırılması görevini üstlenerek hücreleri lipit peroksidasyonundan ve diğer radikal hasarlarından korurlar. Bilinen en basit fenolik bileşik bir hidroksil grubu içeren benzen yani fenoldür ve diğer fenolik maddeler fenolden türeyerek meydana gelirler. Fenolik bileşikler; fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki temel grupta incelenirler.

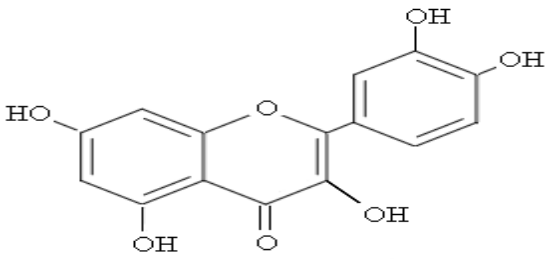
Fenolik asitler, antioksidan özelliğe sahip olup genellikle bitkinin değişik renk ve koku içeren taç kısmında yer alırlar. Bilinen fenolik asitlerden başlıcaları; gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ile ferulik asit, kumarik asit, kafeik asit gibi hidroksi sinnamik asitlerdir.

Flavonoidler insanlar tarafından sentezlenemeyen, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan bitki kimyasallarıdır. C6-C3-C6 yapısında olan flavonoidler, sahip oldukları OH grubu sayısı ve dağılışı yönünden farklılık gösterirler. Şekil 8'de; A halkası üç karbonlu bir bileşik olan sinnamik asitten, C ve B halkaları şikimat ve fenilpranoid metabolik yolu aracılığıyla glukozdan sentezlenir. Fenil halkaları zincire farklı pozisyonlarda bağlandığında, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, antosiyanidinler, flavanlar, izoflavonoidler meydana gelir.

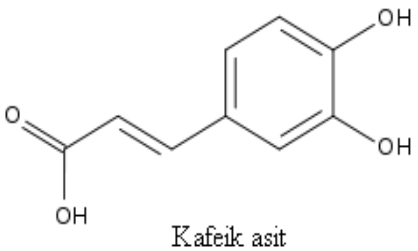


Şekil 8. Flavonoidlerin temel yapısı

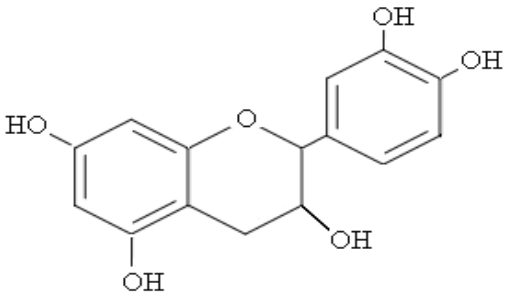
Flavanonlar narinciye meyvelerde, izoflavonoidler baklagillerde, flavonlar baharatlarda, antosiyanin ve kateşinler meyvelerde, flavonoller ise tüm meyve ve sebzelerde bulunur. Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler Şekil 9'da verilmiştir.



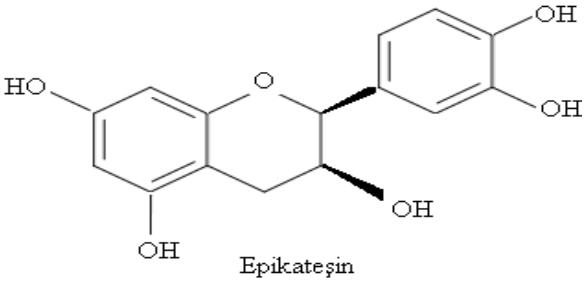
Kuersetin (Flavanol)



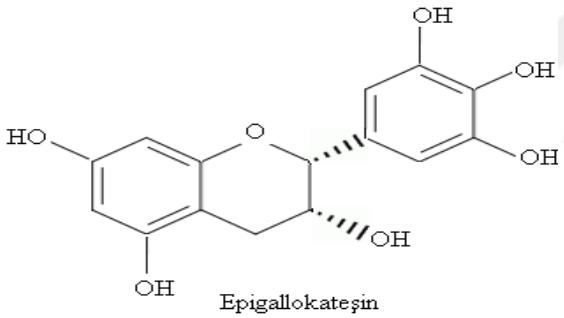
Kafeik asit



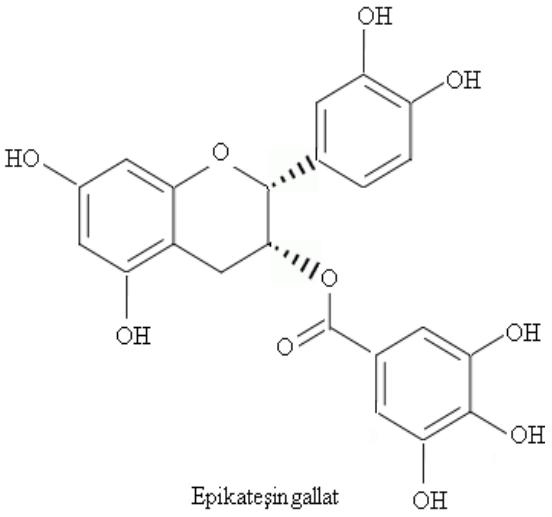
Kateşin (Flavanol)



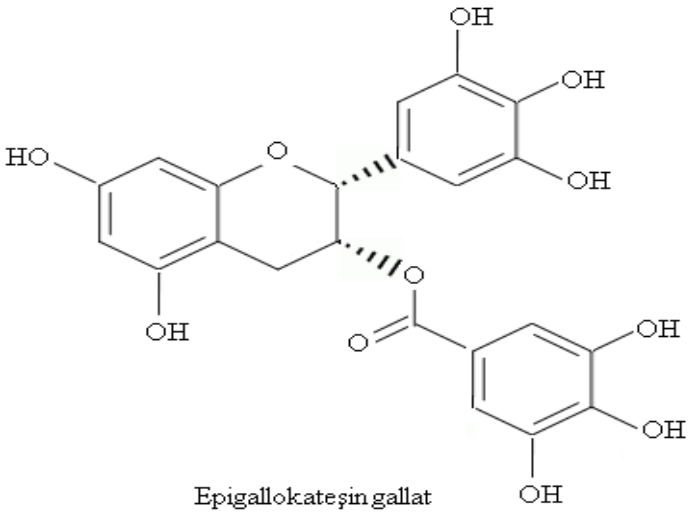
Epikateşin



Epigallokateşin



Epikateşin gallat



Epigallokateşin gallat

Şekil 9. Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları.

Flavonlar, buğday, arpa, mısır gibi tahıllarda ve nane gibi baharatlarda bulunur. Kuersetin, luteolin ve galangin birbirinden farklı yapılara sahip, kuvvetli antioksidan olarak bilinen flavonollerdir. İzoflavonoidler, molekül dizilişlerindeki değişiklikle flavonoidlerden ayrılır. Antosiyaninler, kiraz ve erik gibi yumuşak, kabuksuz meyvelerde, mor lahana, patlıcan ve turp meyvelerde kırmızı ve mavi rengin kaynağını oluşturur. Antosiyaninlerin oldukça güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalardan bilinmektedir (Horton ve Fairhurst, 1987). Flavanlar, karmaşık yapılı, renksiz flavonoidlerdir. Çayda bol miktarda bulunan kateşinler ile leukoantosiyaninler, proantosiyaninler ve taninler bilinen flavanlara örnektir.

Son yıllarda sağlık problemlerinin çözümünde bitkisel kaynaklara ilginin artmasıyla birlikte flavonoidlerle ilgili yapılan çalışmalar da artmıştır. Flavonoidlerin yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında sıkı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin yalnızca antioksidan aktiviteye değil, bunun yanında birçok biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere de sahip oldukları öğrenilmiştir (Guliyev ve Harmandar, 2000). Kumarinler, kan pıhtılaşmasının önlenmesinde, düz kasların kasılmasında, ağrı kesici, yatıştırıcı ve idrar söktürücü etkileriyle bilinirler. Kuersetin ve rutin, lipoprotein oksidasyonunu baskılayarak, hücreyi meydana gelecek hasara karşı korur. Flavonoidlerin oksidatif DNA hasarını serbest radikalle etkileşerek onları tutması dışında mekanizmalarla engellediği son yıllarda yapılan çalışmalarda görülmektedir (Meydani vd, 1990).

1.4. Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) Bitkisinin Özellikleri

Ülkemizde çökülce, çiğdem, adi tükürük otu gibi isimlerle de bilinen, Liliaceae familyasının bir üyesi olan Sakarca bitkisinin üçü endemik olmak üzere 25 türü bulunmaktadır. 20-30 cm boylarında, soğanlı, çok yıllık, otsu bir bitkidir. Ormanlar, kayalık tepeler, yol kenarları, üzüm bağları, fındık bahçeleri ve mezarlıklar gibi pek çok farklı habitatta doğal olarak yetişir (URL-4). Kış ve bahar aylarında nem ihtiyacı fazla olan Sakarca, yaz kuraklıklarına da tolerans gösterebilen ve çabuk yayılan bir bitkidir. Sabah güneşi alan, serin alanlarda daha çok yetişir. Çiçeklenmesi Mart-Haziran aylarında olur. Yaprakları şeritsi, çiçek ekseninden daha uzun ve tüysüzdür.

Sakarca bitkisinin insanlar tarafından gıda olarak tüketildiği ve tedavi yöntemi olarak kullanıldığına dair ilk yazılı kayıtlar incilde yer almaktadır. Ekmek yapmak amacıyla tahıl ile karıştırılarak tüketildiği ve zehirli maddelerin etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla çiçeklerinin kaynatıldığından söz edilmektedir. Soğan yumruları, Dioskorides döneminden beri çıban açıcı ve kusturucu olarak kullanılmaktadır.

Sakarca bitkisi

Sakarca bitkisi Ordu-Giresun yöresinde, halk arasında yaygın olarak tüketilen yabani bitkilerin başında gelmektedir. Fındık bahçelerinde yaygın olarak yetişen bitkinin soğanları ile toprak üstü kısımları pişirilerek sofralardaki yerini almaktadır (Yılmaz vd, 2004).

1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Organizmadaki oksidan-antioksidan dengesinin bozulması sonucu oluşan oksidatif stresin birçok hastalıklığın kaynağı olduğu bilinmektedir. Hastalıkların tedavisinde ya da ortaya çıkması muhtemel hastalıkların önlenmesinde antioksidan özelliği bilinen bileşiklerden yararlanılmaktadır. Bu nedenle, antioksidan tayin yöntemleri geliştirilmiştir.

- Toplam Fenolik Madde Tayini
- 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal temizleme aktivitesi yöntemi

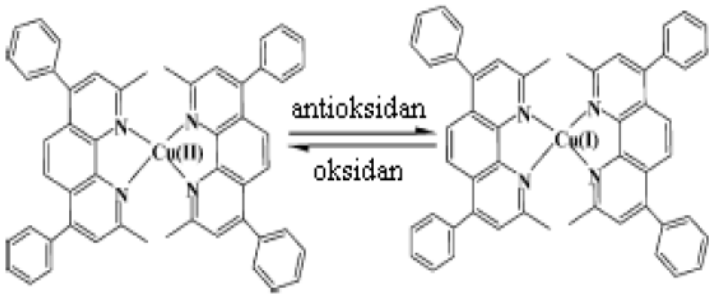
- Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi
- Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi Yöntemi (CUPRAC)
- Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)
- Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi
- Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)
- Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)
- Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi
- Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite (TOSC) Yöntemi.
- Oksijen radikal absorbsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC)

1.5.1. Toplam fenolik madde tayini

Bu yöntem fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden, molibdenyuma elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Folin reaktifi ile alkali ortamda mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşiti (mg/L) olarak verilir. FC yöntemi toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır (Slinkard ve Singleton, 1977).

1.5.2. Bakır (II) indirgenme antioksidan kapasitesi yöntemi (CUPRAC)

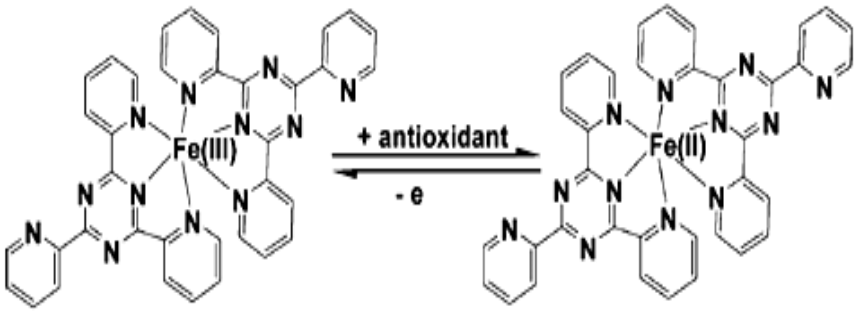
Yöntemin esası, numunede bulunan antioksidanlar tarafından Cu(II)'nin Cu (I)'e indirgenmesine dayanmaktadır. Şekil 10'da gösterilmiştir. Kromojenik ayıraç olan bathocuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin), Cu (I) ile kompleks oluşturur. Bu kompleks 490 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. CUPRAC reaktifi, ABTS, DPPH gibi kromojenik radikal reaktiflerden daha kararlıdır ve daha kolay temin edilebilir. Renkli şelat veren redoks reaksiyonu güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmemektedir. Askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kuersetin için CUPRAC yöntemi birkaç dakikada tamamlanırken, daha kompleks yapılı moleküller için 30-60 dakika gerekmektedir (Apak vd, 2004).



Şekil 10. Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi

1.5.3. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)

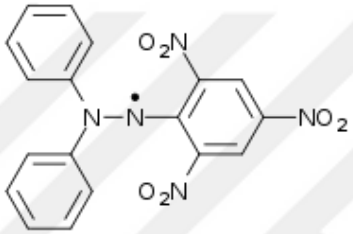
Düşük pH'da Fe^{+3}'ün Fe^{+2}'ye indirgenmesi renkli ferrik tripridiltriazin [Fe (III) $(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ= 2,4,6-tripyridyl-s-triazine)] kompleksinin oluşmasına neden olur. Fe^{+3}'ün Fe^{+2}'ye indirgenmesi Şekil 11'de gösterilmiştir. Asidik ortamda, antioksidanların varlığında ferrik tripridiltriazin kompleksi Fe^{+2}'ye indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm dalga boyunda absorbans artışına neden olur. Sonuçlar troloks eşiti olarak ifade edilir (Albayrak vd, 2010).



Şekil 11. Fe^{+3}'ün Fe^{+2}'ye indirgenmesi

1.5.4. DPPH radikali temizleme aktivitesi yöntemi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. Antioksidan tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına neden olur. Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunun % 50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC_{50} değeri ile verilir. Bu yöntemde, antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir (Cuendet vd,1997). Ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Şekil 12'de DPPH molekülünün molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 12. DPPH radikalinin molekül yapısı.

1.6. Eritrosit ve Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri hücrelerin neredeyse tamamında belirli miktarlarda üretilir. Serbest radikaller, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleri ve kolestrol ile çok kolay tepkimeye girebildiklerinden, lipitler bu radikaller tarafından hücresel hasarın oluşmasında ana hedef molekül durumundadır. ROS'lar hücre zarlarında lipit peroksidasyonuna yol açarak, proteinlerinin parçalanmasına, zar yapısı, geçirgenliği gibi işlevsel özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır.

Eritrositlerde fazla miktarlarda çoklu doymamış yağ asitleri, moleküler oksijen ve ferroz demir bulunur (Clemens ve Waller, 1987). Eritrositler oksidadif strese uğradıklarında, membran geçirgenliklerinin bozulduğu ve hemolize uğradıkları gözlenmiştir bozulmuş (Van Der Zee vd, 1985).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Kullanılan cihazlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan cihazlar

Cihaz	**Markası**
Etüv	Memmert
Öğütücü	Straume
Derin dondurucu	Vestel FT-290
Çalkalayıcı inkübatör	Biosan TS-100
Evoparatör	Heidolph Laborota 4000
Ultrasonik temizleyici	Elma ELP070H
Hassas Terazi	Precisa XB 220 A
Elisa okuyucu	Thermo Scientific Multiskan
Vorteks	Velp scientica
Santrifüj	Thermo Scientific Heraeus Multifuge 3SR+
Çalkalayıcı su banyosu	Nüve st 402
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Are Velp Scientifica
pH metre	Thermo Scientific Orion 3 star
Mikroplaka yıkayıcısı	BioTek Elx50
Buzdolabı	Beko BK 7121 T

2.2.Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve markaları Tablo 5'te, kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan kimyasallar maddeler

Kimyasal Adı	Marka
Asetik asit	Merck
DPPH	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Etil Asetat	Merck
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Sigma-Aldrich
HCl	Merck
Quercetin	Sigma-Aldrich
Metanol	Merck
Na_2CO_3	Merck
NaoH	Merck
Trikloro asetik asit(TCA)	Merck
H_2O_2	Merck
DMSO	Merck
BSA	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue-G250	Thermo-Fisher Scientific
Gallik asit	Sigma-Aldrich
Troloks	Sigma-Aldrich
BHT	Sigma-Aldrich
DTNB	Alfa aesar
Guanidin HCl	Sigma-Aldrich
DNPH	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
K_2HPO_4	Merck
KH_2PO_4	Merck
TBA	Merck
NaN_3	Merck
İndirgenmiş Glutatyon	Sigma-Aldrich

Tablo 6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin Kullanılan Çözeltiler	
0,2 N Folin-Ciocalteu	2N'lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 10 kat seyreltilerek hazırlandı..
%7'lik (w/v) Na_2CO_3	7 gr Na_2CO_3 alınarak ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
Quercetin (1 mg/mL)	0.01g kuersetin 10 mL metanolle çözülerek stok çözelti hazırlandı.
Gallik Asit (1 mg /mL)	0.01 g galik asit 10 mL metanolle çözülerek stok çözelti hazırlandı.
Toplam Flavonoid Miktarı İçin Kullanılan Çözeltiler	
%10 Aliminyum Klorür	100 mL'si için: 18,11g $ALCL_3.6H_2O$ tartılıp bir miktar saf suda çözülerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı..
1M Potasyum Asetat	9.815g KCH_3CO_2 tartılıp bir miktar saf suda çözülerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Quercetin (1 mg/mL)	0.01g guercetin 10 mL metanolle çözülerek stok çözelti hazırlandı.
DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler	
DPPH Reaktifi (100mM)	100 mL'si için: 3.94 mg DPPH reaktifi tartılıp 90 mL metanolle çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
BHT (1 mg/mL)	0. 001g BHT reaktifi tartıldı 1mL metanolle çözülerek stok hazırlandı.
	Stok Çözeltisi metanolle seyreltilerek diğer (200-100-50-25-12,5-6,25 μg/mL) konsantrasyonlar hazırlandı.
CUPRAC Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
Troloks (1 mg/mL)	0.001gr Troloks 1 mL metanolle çözülerek stok çözelti hazırlandı.
	Stok Çözelti metanolle seyreltilerek diğer (0,5-0,25-0,125-0,0625-0,0312 mg/mL) konsantrasyonlar hazırlandı.
7.5mM Neokuproin	78mg Neokuproin bir miktar metanolle çözülerek 50 mL'ye
Çözeltisi	metanol ile tamamlanarak hazırlandı.
10 mM $CuCl_2.2H_2O$	85.24 mg $CuCl_2.2H_2O$ bir miktar saf su ile çözülerek 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
1 M $NH_4CH_3COO^-$	3.8gr 1 M $NH_4CH_3COO^-$ bir miktar saf su ile çözülerek 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı(pH:7).

FRAP Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

HCl (100mM)	25ml saf suyun üzerine %37'lik HCl'den 205µL ilave edilerek hazırlandı.
TPTZ (10 mM)	46.8 mg TPTZ 6mL 100 mM'lık HCl içinde çözülerek üzerine 9 mL metanol ilave edilip hazırlandı.
$FeCl_3$ (20 mM)	48.6 mg $FeCl_3$ 6 mL saf su ile çözülerek üzerine 9 mL metanol ilave edilip hazırlandı.
Asetat Tamponu	
(300mM, pH 3,6)	2.325gr $NaCH_3COO.3H_2O$ üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildir.750 mL'ye saf su ile tamamlandı.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM $FeCl_3$ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlandı.
Troloks (1 mg/mL)	0.001gr Troloks 1 mL metanolle çözülerek stok çözelti hazırlandı.
	Stok Çözelti metanolle seyreltilerek diğer (0,5 -0,25-0,125-0,0625-0,0312 mg/mL) konsantrasyonlar hazırlandı.

MDA Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

%28 TCA Çözeltisi	28 g trikloroasetik asit bir miktar saf suda çözünerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
TBA Çözeltisi	0,1 g NaOH ve 0,1 g 2-tiyobarbütirik asit alınarak son hacim 10 mL'ye tamamlandı.
%0,9'luk NaCl	9 g NaCl bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.
PBS Çözeltisi	1000 mL %0,9'luk NaCl çözeltisine 1.76 mL 0.5 M KH_2PO_4 ve 6.08 mL K_2HPO_4 ilave edilerek, pH 7.4'e ayarlandı.
0,02 M NaN_3 Çözeltisi	0,13 gr NaN_3 bir miktar saf suda çözülerek hacmi PBS ile 50 mL'ye tamamlandı.
600 mM H_2O_2	0,309 mL H_2O_2 alınarak hacmi saf suyla 5 mL'ye tamamlandı.

Tiyol(-SH) Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Çöktürücü Solüsyon	7,5 gr NaCl, 0,05 gr EDTA, 0,418 gr metafosforik asit tartılarak son hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.
DTNB	0,004 gr DTNB tartılarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
0,3 M Na_2HPO_4	2.13 gr Na_2HPO_4 tartılarak son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
600 mM H_2O_2	0,309 mL H_2O_2 alınarak hacmi saf suyla 5 mL'ye tamamlandı.
İndirgenmiş Glutatyon (1 mg/mL)	1 mg indirgenmiş glutatyon 1 mL saf suda çözülerek stok hazırlandı.

Eritrosit Hücre Zarı Eldesinde Kullanılan Çözeltiler	
%0,9'luk NaCl	9 gr NaCl tartılarak 1 lt saf suda çözüldü.
PBS yıkama tamponu	0,1325 gr K_2HPO_4, 0,03 gr KH_2PO_4 tartılarak 250 mL NaCl'de çözüldü, pH 7,4'e ayarlandı.
Patlatma tamponu	0,17 gr KH_2PO_4, 0,2175 gr K_2HPO_4 tartılarak 250 mL saf suda çözüldü pH 8'e ayarlandı.
Birinci yıkama tamponu	0,17 gr KH_2PO_4, 0,216 gr K_2HPO_4 tartılarak 500 mL saf suda çözüldü ve pH 8'e ayarlandı.
İkinci yıkama tamponu	0,084 gr KH_2PO_4, 0,108 gr K_2HPO_4 tartılarak 500 mL saf suda çözündü pH 8'e ayarlandı.
0,1 N KOH	0,14 gr KOH tartılarak 25 mL saf suda çözüldü.

Eritrosit Hücre Zarı Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	
BSA	5 mg BSA standartı tartılarak, 1 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
Bradford çözeltisi	2,5 mg comassie blue G-250, 1,25 mL %95'lik etanol ve 2,5 mL %85'lik ortofosforik asit karıştırılarak bir miktar saf suda çözüldü. Son hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.

Protein Karbonil Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	
600 mM H_2O_2	0,309 mL H_2O_2 alınarak hacmi saf suyla 5 mL'ye tamamlandı.
%20 TCA	20 g trikloroasetik asit bir miktar saf suda çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
Etanol:Etil Asetat	1:1 oranında etil alkol ve asetat çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.
2,5 M HCl	%37'lik HCl'den 2,07 mL alınarak hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
10 mM DNPH	0,01 gr DNPH bir miktar HCl'de çözülerek hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
20 mM K_2HPO_4 İçeren 6 M Guanidin Hidroklorid	0,087 gr K_2HPO_4 bir miktar saf suda çözüldü. 13,95 gr Guanidin HCl eklenerek son hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.

2.3. *Ornithogalum umbellatum* 'un Toplanması

2018 Şubat ayında Giresun'da toplanan *Ornithogalum umbellatum* (sakarca) yaprak, soğan ve çiçek olmak üzere kısımlarına ayrıldı. Kaba kirleri çıkacak şekilde musluk suyunda yıkandıktan sonra 37 ^{o}C'de kurutulmak üzere etüve bırakıldı. Bitkinin soğan kısmı etüvün sıcaklığı 45 ^{o}C'ye çıkarılarak yaprak ve çiçek kısımları kuruduktan sonra birkaç gün daha etüvde bekletildi. Kurutulan bitki kısımları öğütücüde toz haline getirilerek ekstraksiyona (özütlemeye) hazır bir şekilde bekletilmek üzere -20 ^{o}C'de derin dondurucuya konuldu.

2.4. *Ornithogalum umbellatum* Özütlerinin Hazırlanması

Toz halindeki numunelerden 3'er gram tartılarak 100 mL metanolde çalkalayıcı inkübatörde 24 saat özütleme işlemine tabi tutuldu. Daha sonra süzüntü alındı ve evoparatörde çözücüleri uçuruldu. Özütlerin kuru gram ağırlıkları 50 mg/mL olacak şekilde hesaplanarak gerekli miktarda DMSO eklendi ve ultrasonik temizleyici yardımıyla çözüldü.

Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere eppendorf tüplerinde aligotlandı ve -20 ^{o}C'de derin dondurucuda saklandı. Özütleme işleminde özütler metanol ile muamele edildiğinden, deneylerde seyreltme çözeltisi olarak metanol kullanıldı.

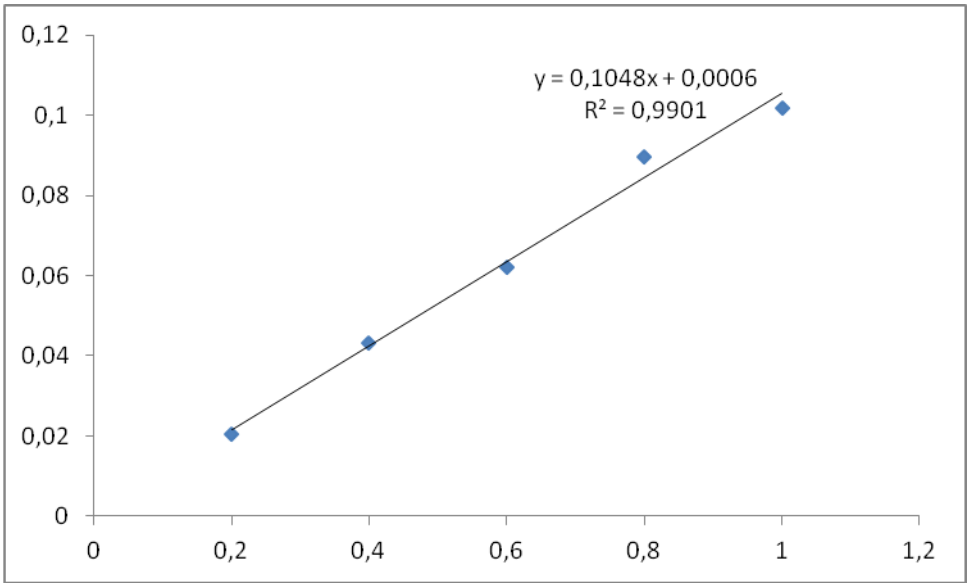
2.5. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Metanolde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması yöntemin esasıdır. Mor-menekşe renginde oluşan kompleks 700 nm'de maksimum absorbans oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977). Özütlerdeki toplam fenol miktarları bu yöntemle spektrofotometrik olarak tayin edildi. Gallik asit standart maddesi kullanılarak 5 farklı konsantrasyonda (1 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2 mg/mL) Tablo 7'deki gibi çalışıldı. Daha sonra 2 saat oda sıcaklığında ışık almayan ortamda inkübasyona

bırakıldı ve bu zaman sonunda 700 nm'de köre karşı okuma yapıldı. Numunelerin toplam fenolik içerikleri elde edilen kalibrasyon grafiğine (Şekil 10) göre hesaplandı.

Tablo 7. Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için pipetleme hacimleri

	Kör (mL)	**Numune (mL)**	**Standart (mL)**
Numune	-	0,05	-
Standart	-	-	0,05
Deiyonize su	2,55	2,50	2,50
0,2 N Folin Reaktifi	0,25	0,25	0,25
	Tüpler vortekslendi ve 3 dakika sonra		
%7 Na_2CO_3	0,75	0,75	0,75

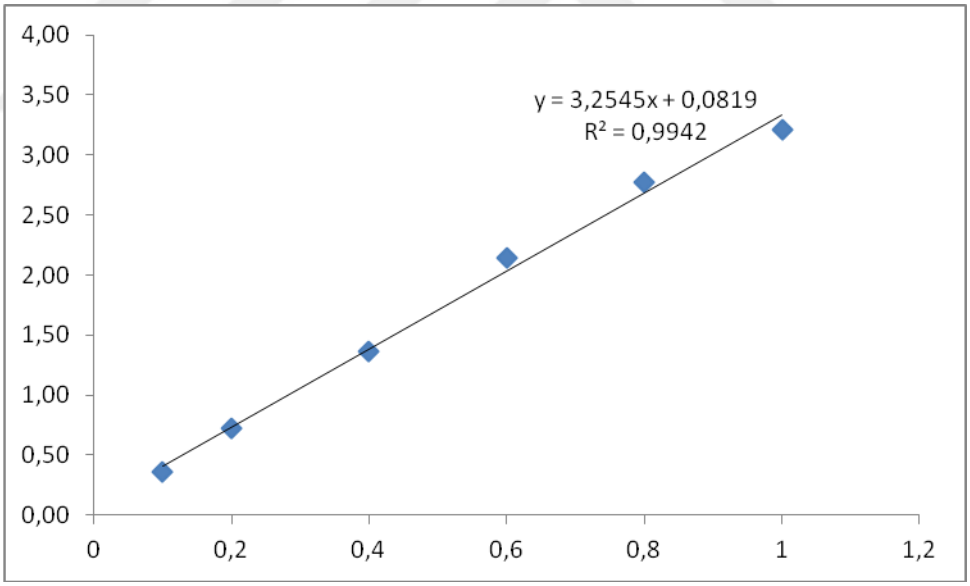


Şekil 13. Gallik asit kalibrasyon grafiği

2.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi

Özütlerin toplam flavonoid miktarı Alüminyum Klorür/Potasyum Asetat yöntemine göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Yöntemin esası; etanol, alüminyum (III) klorür çözeltisi ve potasyum asetat çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine flavonoid çözeltisinin (flavon, flavonol veya izoflavon bileşikleri) ilave edilmesi ve bu işlemi takip eden 30 dakika sonunda köre karşı 415 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesine dayanmaktadır (Sahanaka vd, 2005).

Çalışmada, standart madde olarak kuersetin günlük taze hazırlanarak kullanıldı. Kuersetin çözeltileri metanol ile 6 farklı konsantrasyonda (1 - 0.8 - 0,6 - 0,4 - 0,2 – 0,1 mg/mL) hazırlandı. Tablo 8'deki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüm tüpler vortekslenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerin absorbansları 415 nm dalga boyunda spektrofotometre aracılığıyla ölçüldü. Toplam flavonoid madde miktarları elde edilen kalibrasyon grafiğine (Şekil 14) göre hesaplandı.



Şekil 14. Kuersetin kalibrasyon grafiği

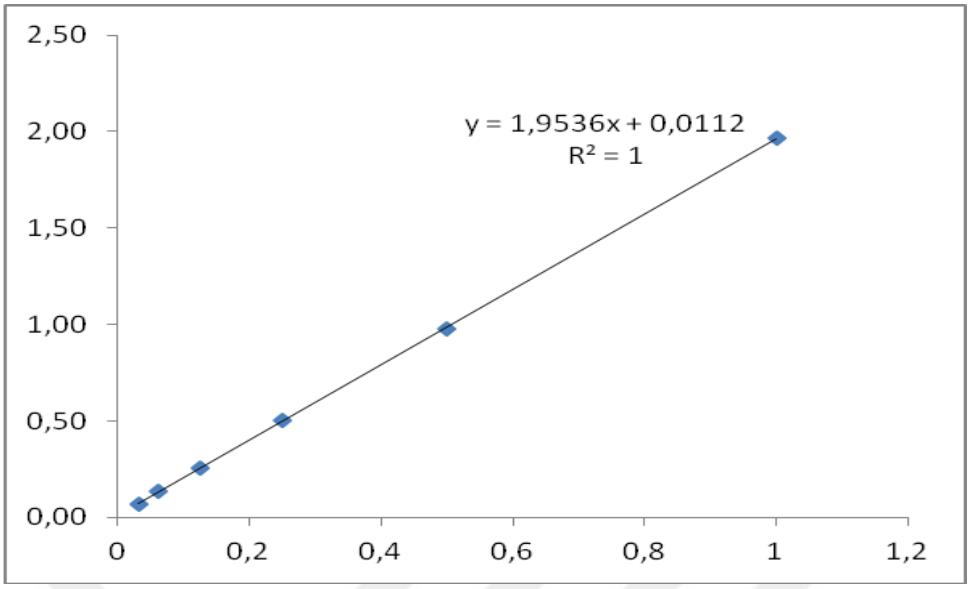
Tablo 8. Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için pipetleme miktarları

	Kör	Numune	Standart
Numune	-	0,25	-
Standart	-	-	0,25
Deiyonize su	2,50	2,25	2,25
%10 $AlCl_3.6H_2O$	0,05	0,05	0,05
1 M Potasyum Asetat	0,05	0,05	0,05

2.7. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

FRAP metodunda Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris(2-pridil)-S-triazin) kompleksinin ortamda antioksidan madde bulunması durumunda indirgenmesi sonucu meydana gelen mavi renkli Fe(II)-TPTZ kompleksinin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esas alınmaktadır (Benzie ve Strain, 1999).

Çalışmada, standart olarak Troloks kullanıldı. Standart farklı konsantrasyonlarda (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,03125 mg/mL) metanol ile hazırlandı. Özütler 10 mg/mL konsantrasyonların da olacak şekilde metanol ile seyreltilerek hazırlandı. FRAP reaktifi deneyin diğer hazırlıkları yapıldıktan sonra, kullanılmadan hemen önce hazırlandı. Standart/özüt çözeltilerinden 50'şer µL alınıp, üzerine 1,5 mL FRAP reaktifi eklendi. Kör olarak standart ve özütlerin seyreltme çözücüsü olan metanol kullanıldı. Tüpler vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Sürenin sonunda deney ortamının absorbansları 565 nm dalga boyunda spektrofotometre ile belirlendi. Elde edilen troloks kalibrasyon grafiği Şekil 15'te verilmiştir. Numunelerin FRAP değerleri standart olarak kullanılan Troloks ile karşılaştırılarak gram kuru ağırlıkta mg Troloks eşdeğer FRAP aktivitesi (mg TEFA/g K.A) şeklinde ifade edildi.

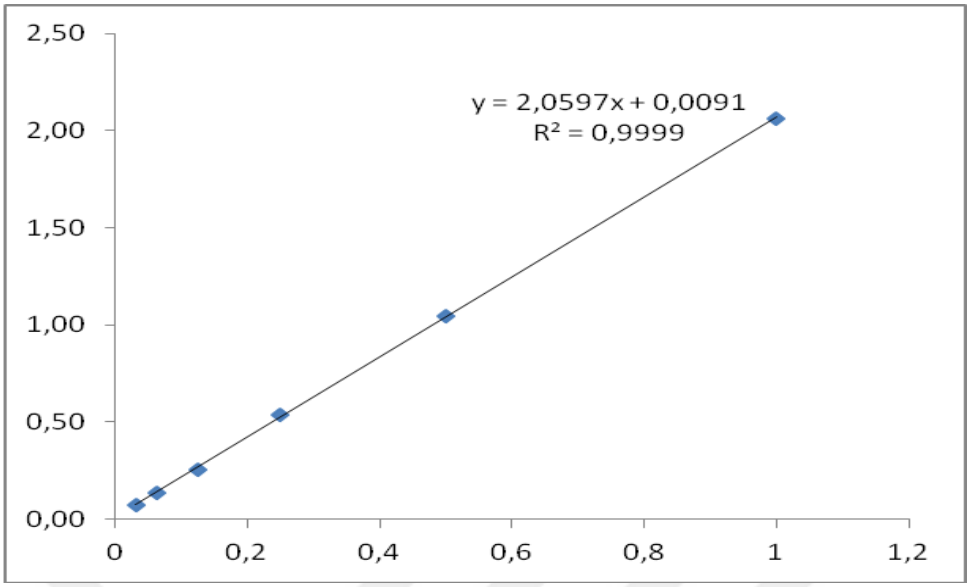


Şekil 15. Troloks kalibrasyon grafiği

2.8. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Nc), Cu (II) ile Cu(II)-Nc kompleksini oluşturur. Oluşan bu kompleks, ortamda antioksidan madde bulunduğunda şelat [bakır(I)-neokuproin(Cu(I)-Nc)] oluşturur. Şelatın 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esas alınarak, antioksidan kapasite hesaplanır (Apak vd, 2007).

Çalışmada standart olarak Troloks kullanıldı. Standart 6 farklı konsantrasyonda (1 - 0,5 - 0,25 – 0,125 - 0,0625 - 0,0312 mg/mL) metanol ile hazırlandı. Özütler 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde metanol ile seyreltilerek hazırlandı. Özüt/standart çözeltilerinden 50'şer µL alınıp, üzerine 100 µL $NH_4CH_3COO^-$ ve 100 µL $CuCl_2.2H_2O$ eklendi. Kör olarak standart ve özütlerin seyreltme çözücüsü olan metanol kullanıldı. Özüt/standart çözeltilerine 100 µL Nc reaktifi eklendi ve tüpler vortekslendikten sonra oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda deney ortamının absorbansları 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile belirlendi. Elde edilen troloks kalibrasyon grafiği Şekil 16'da verilmiştir. Numunelerin CUPRAC değerleri gram kuru ağırlıktaki troloks eşdeğer CUPRAC aktivitesi (TECA/g K.A) şeklinde ifade edildi.



Şekil 16. Troloks kalibrasyon grafiği

2.9. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup çalışmada bu radikalin 100 µM'lık metanolik çözeltisi özütlerde günlük,taze hazırlanarak kullanıldı. Çalışmada Coudent yöntemi kullanıldı (Cuendet vd, 1997). Özütler 2 – 1,5 – 1 – 0,5 – 0,25 mg/mL konsantrasyonlarında metanol ile seyreltilerek hazırlandı. Ölçümler mikroplaka üzerinde yapıldı. 150 µL'lik DPPH çözeltisi, 150 µL'lik özüt çözeltileri üzerine eklenerek (eşit hacimde) çalkalandı ve oda sıcaklığında 40 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Her bir özüt konsantrasyonu için birer kör [(özüt+DPPH çözücüsü(metanol)] ve her bir çözücüsü (metanol) için de kontrol tüpleri (DPPH+özüt çözücüsü) paralel çalışıldı. İnkübasyon sonunda DPPH'ın maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. İki paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamalardan çıkarıldı. Absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe aktarılarak SC_{50} değerleri hesaplandı.

2.10. Lipit Peroksidasyonunu Engelleme Kapasitesinin Belirlenmesi

2.10.1.Eritrosit paketinin hazırlanması

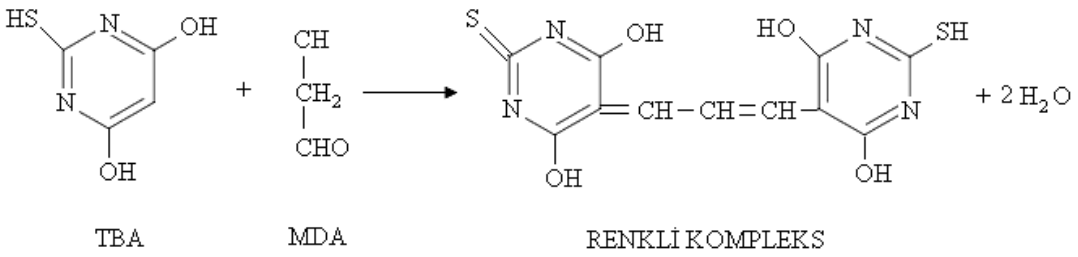
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi kan bankasından temin edilen sağlıklı tam kanlar önce 600 g'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi ve plazma kısmı uzaklaştırıldı. Ardından eritrosit paketi %0,9'luk NaCl ile hacminin 3-4 katına tamamlanıp 4.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek trombosit ve lökosit fazlaları da uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlem iki defa tekrarlandı. Daha sonra aynı hastanenin laboratuvarında eritrositlerin hemoglobin değeri ölçüldü.

2.10.2.Hücre süspansiyonlarının hazırlanması

Çalışmada reaksiyon ortamının hazırlanmasında Stocks ve Dormandy metodundan yararlanıldı (Stocks ve Dormandy, 1971). Eritrosit paketi hastanede okunmuş hemoglobin değerine göre son konsantrasyonu 3 g/dL olacak şekilde PBS'li NaN_3 ile seyreltildi ve 37 ^oC'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Böylece stok çözelti hazırlanmış oldu. MDA miktar tayininde, toplam tiyol düzeyinin belirlenmesi ve eritrosit hücre zarlarında protein karbonil miktarının belirlenmesi yöntemlerinde standart olarak güçlü antioksidan özelliği bilinen Cimin üzümü kullanıldı (Ekinci, 2008). Hazırlanan çalışma tüplerinin her birine 1 mL stok, ortamdaki konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde özüt/standart (her biri ayrı) ilave edildi, PBS içeren bir de kör tüpü hazırlandı. 1 saatlik ön inkübasyonun sonunda ortama yapılan konsantrasyon taraması doğrultusunda (Ek 1) uygun görülen miktar olan 20 mM'lık H_2O_2 ekleneceği göz önünde bulundurularak son hacim PBS ile 1,5 mL'ye tamamlandı. Ardından 1 saat 37 ^oC'de çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik ön inkübasyon sonunda çalışma tüplerine daha önce belirtilen miktarda H_2O_2 ilave edilerek 1 saat daha 37 ^oC'de çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası MDA miktar tayini yapıldı.

2.10.3. MDA miktar tayini

Lipitlerin peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA),TBA çözeltisi ile ısıtılması sonucu pembe renkli kompleks meydana getirir (Şekil 17). Bu kompleksin konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak belirlenmesi ile MDA tayin edilir. Meydana gelen reaksiyon şekilde gösterildi.



Şekil 17. MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon.

İnkübasyon süresi biten çalışma tüplerinden 600 µL alınarak üzerine 400 µL TCA çözeltisi eklendi ve 4.500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 600 µL süpernatan alınarak üzerine 300 µL günlük taze olarak hazırlanmış TBA çözeltisi eklendi. 15 dk kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Meydana gelen renkli çözeltinin absorbansı 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okunarak MDA miktarları formüle göre hesaplandı.

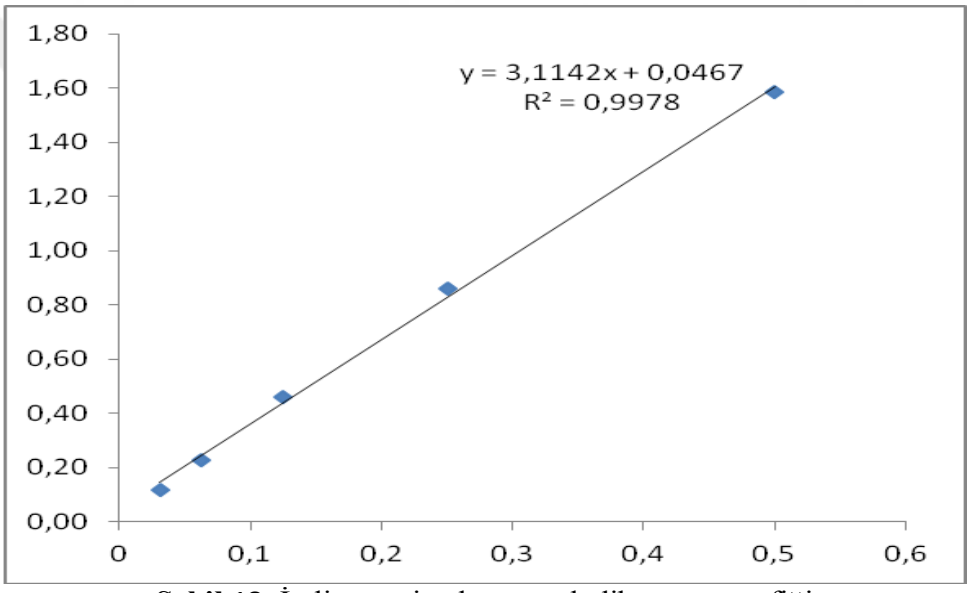
[MDA]=(A532-A600)*900=nmol MDA/g Hb

2.11. Toplam Tiyol (-SH) Düzeylerinin Belirlenmesi

Eritrositlerdeki toplam tiyol düzeyleri Beutler yöntemi esas alınarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Beutler vd, 1957). Standart grafik indirgenmiş glutatyonun 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,03125 mg/mL'lik konsantrasyonları hazırlanarak oluşturuldu (Şekil 18).

Çalışma için yaprak, çiçek, soğan ve üzüm çekirdeği özütlerinin bulunacağı deney tüpleri ile negatif kontrol amaçlı sadece eritrosit paketi bulunduracak kör tüpü ve pozitif kontrol amaçlı eritrosit paketi ile H_2O_2 içerecek tüpler hazırlandı. Eritrosit paketleri, her bir çalışma tüpüne eklendikten sonra ortamdaki konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde

özütler de eklenerek tüpler 1 saat 37 ^{o}C'de ön inkübasyona bırakıldı. 1 saatin sonunda çalışma tüplerine, eritrositlerde oksidatif hasar ouşturmak amacıyla ortamdaki konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H_2O_2 ilave edildi. Çalışma tüplerinin son hacimleri PBS ile tamamlanarak eşitlendi ve 1 saat daha 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, her bir çalışma grubundan 100 µL, hazırlanan çöktürücü solüsyondan 3 mL ve 1,9 mL soğuk saf su alınarak 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda her bir çalışma grubu süzüldü. Süzüntülerden ve standart (indirgenmiş glutatyon) çözeltilerinden 400 µL, 2 mL 0,3 M Na_2HPO_4 ve 0,5 mL 40 mg/dL DTNB çözeltileri alınarak 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra absorbansları 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.



Şekil 18. İndirgenmiş glutatyon kalibrasyon grafiği

2.12. Protein Oksidasyonunu Baskılama Kapasitesinin Belirlenmesi

Özütlerle muamele edilen ve oksidatif stres oluşturulan eritrosit hücre zarlarında protein oksidasyonunu baskılama kapasitesi, protein oksidasyonunun en önemli belirteci ve kararlı son ürünlerinden biri olan protein karbonil miktarlarına bakılarak belirlendi (Büyükgüzel, 2013).

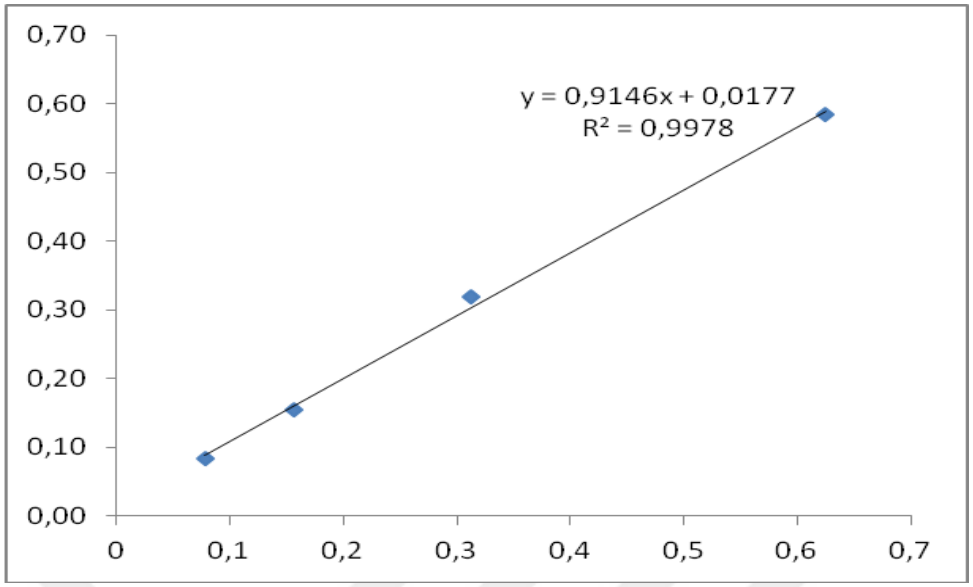
2.12.1. Eritrosit hücre zarı eldesi

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi kan bankasından temin edilen tam kanlardan, falcon tüplerinde havuz oluşturuldu. Kanlar 1.500 g'de +4 ^{o}C'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma aspire edildi, 20 mL kadar PBS yıkama tamponu ilave edildi ve 3.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ikinci kez tekrarlandı. Plazma aspire edildi ve 25 mL PBS tamponu ilave edilerek 3.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma aspire edildi, kalan kısım ikiye bölünerek her birinin üzerine 30 mL patlatma tamponu ilave edildi. İyice çalkaladıktan sonra hassas terazi yardımıyla tartılarak hacimler eşitlendi. 20.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Eritrosit hücre zarı (GHOST) görüldü ve plazma dikkatlice aspire edildi. 30 mL kadar birinci yıkama tamponu ilave edildi, çalkalanarak tartıldı, 20.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Plazma aspire edilerek 30 mL ikinci yıkama tamponu eklendi, çalkalanarak tartıldı, 20.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Son olarak plazma aspire edildi ve tüpler birleştirilerek vortekslendi. Üzerine 5 mL KOH ilave edildi ve bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra aligotlanarak -20^{o}C'ye kaldırıldı. Kullanılan bütün tamponlar soğuk olarak eklendi ve beklemeden santrifüj işlemi yapıldı (Dodge vd, 1963).

2.12.2. Eritrosit hücre zarı protein miktarının belirlenmesi

Eritrosit hücre zarı protein içeriği Bradford yöntemi ile BSA standartı kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Bradford, 1976). Yöntemin esası, reaktif olarak kullanılan boyanın (comassie blue) proteinlere bağlanarak renk oluşturmasına dayanır. Oluşan rengin şiddeti ile protein yoğunluğu doğru orantılıdır.

Sığır serum albümin (BSA) standartı 1 – 0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 – 0,1 – 0,05 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanarak Şekil 19'daki kalibrasyon grafiği elde edildi. Eritrosit hücre zarı saf su ile 10 kat seyreltildi. Pipetlemeler mikroplaka üzerine yapıldı. Standart, eritrosit hücre zarı ve kör olarak çözücüleri olan saf su 10'ar µL alınarak üzerine 100 µL Bradford çözeltisi eklendi ve absorbanslar beklemeksizin 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi.



Şekil 19. BSA kalibrasyon grafiği

2.12.3. Eritrosit hücre zarı protein karbonil miktarının belirlenmesi

Eritrosit hücre zarında protein karbonil miktarı Levine yönteminin modifiye haliyle belirlendi (Colombo vd, 2016). Protein içerikleri belirlenen eritrosit hücre zarları, çalışmada kullanılmak üzere 1 mg/mL'lik protein konsantrasyonuna sahip olacak şekilde saf su ile seyreltildi. 400 µL eritrosit hücre zarı alınarak, ortamdaki konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde yaprak, çiçek, soğan ve üzüm çekirdeği özütleri eklendi, PBS içeren bir kör tüpü ile negatif kontrol amaçlı özütsüz bir tüp hazırlanarak (her biri daha sonra ayrı çözeltiler eklenerek gruplandırılacağı için 2'şer tane hazırlandı) 1 saat 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra ortamdaki konsantrasyonu 20 mM olacak kadar H_2O_2 eklendi ve son hacimler PBS ile 600 µL'ye tamamlanarak 1 saat daha 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda her bir deney ortamı test (T) ve kontrol(K) şeklinde ikiye ayrıldı. 600 µL'lik test grupları üzerine 120 µL DNPH, yine 600 µL'lik kontrol grupları üzerine ise 120 µL HCl eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Çalışma tüpleri inkübasyon süresi içerisinde her 15 dakikada bir vortekslendi. Sürenin sonunda her bir çalışma tüpüne 1:1 oranında %20 TCA (soğuk) eklendi ve 15 dakika buz içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası çalışma tüpleri bitince 10.000 g'de +4 ^{o}C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan uzaklaştırıldı ve protein pelletleri 1 mL %20 TCA eklenerek vortekslendi, 10.000 g'de +4 ^{o}C'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Süpernatan

uzaklaştırıldı. Her bir çalışma tüpüne 1 mL 1:1 hazırlanan etanol:etil asetat çözeltisi eklenerek 10.000 g'de +4 ^{o}C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan uzaklaştırıldı. Protein pelletleri 1 mL 6 M Guanidin HCl'de vortekslenerek iyice çözüldü ve 20 dakika 37 ^{o}C'de ısıtmalı çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Protein karbonilin maksimum absorbans verdiği 366 nm dalga boyunda çalışma ortamlarının absorbansları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Molar absorpsiyon katsayısından yararlanarak formüle göre hesaplama yapıldı.

Protein karbonil miktarı (nmol/mL) = ($A_T - A_K$) / 22000 / 10^6

Protein karbonil miktarı (nmol/ mg protein) = Protein karbonil (nmol/mL) / Protein (mg/mL)

2.13. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi SPSS programı kullanılarak yapıldı. Çalışma gruplarına ait ilgili parametrelerin anlamlılıkları Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile belirlendi. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin Toplam Fenolik Madde İçerikleri

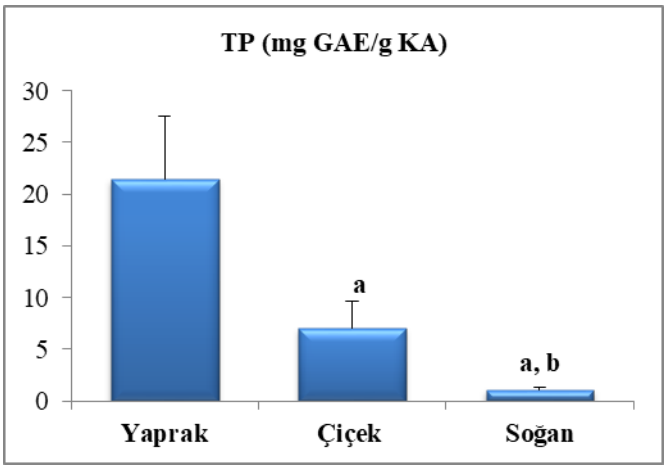
Sakarca bitkisinin yaprak, çiçek ve soğanlarından elde edilen özütlerdeki toplam fenolik madde içerikleri, standart madde olarak kullanılan gallik asit için hazırlanan standart grafik kullanılarak belirlenmiştir. 1 gram özüt içeriğindeki toplam fenolik madde miktarı mg gallik asit eşdeğer (mg GAE/g kuru ağırlık) olarak Tablo 9 ve Şekil 20'de verilmiştir.

Tablo 9. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam fenolik madde miktarı

Numune (n=10)	**TP (mg GAE/ g kuru ağırlık)**
Yaprak	21,5 ± 6,0
Çiçek	7,1 ± 2,5 [a]
Soğan	1,1 ± 0,2 [a,b]

a: Yaprak özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Yaprağın toplam fenolik madde içeriği hem çiçek hem de soğandan daha fazla miktarda olduğu tespit edilmiş ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde Sakarca bitkisinin çiçeğinde soğana kıyasla yüksek miktarda toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğu belirlenmiş ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 20. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam fenolik madde miktarı

a: Yaprak özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Numunelere ait toplam fenolik madde miktarı yüksek düşüğe doğru sıralandığında sıralamanın **yaprak > çiçek > soğan** şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

3.2. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin Toplam Flavonoid (TF) Madde İçerikleri

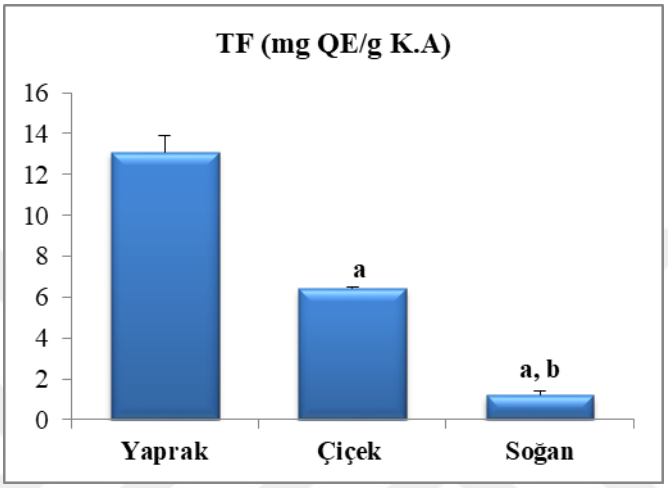
Sakarca bitkisinin farklı kısımlarına ait özütlerin toplam flavonoid içeriği, standart madde olarak kullanılan kuesertin için hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bulunmuştur. Sonuçlar mg kuesertin eşdeğer gram kuru ağırlık (mg QE/ g K.A) olarak Tablo 10 ve Şekil 21'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam flavonoid madde miktarı

Numune (n=10)	**TF (mg QE/ g K.A)**
Yaprak	13,1 ± 0,8
Çiçek	6,4 ± 0,1 [a]
Soğan	1,2 ± 0,2 [a,b]

a: Yaprak özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden p<0,001 istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Yapılan istatistik analiz sonucunda sakarca bitkisinin yaprak özütünün diğer kısımlardan elde edilen özütlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek toplam flavonoid içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Çiçek özütü ile soğan özütü karşılaştırıldığında çiçek özütünün toplam flavonoid madde muhtevasının soğan özütüne göre fazla olduğu tespit edilmiştir. İki özüt arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı seviyede bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 21. Sakarca bitkisine ait özütlerin toplam flavonoid madde miktarı
a: Yaprak özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden $p<0,001$ istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Bitkinin farklı kısımlarına ait özütlerin toplam flavonoid madde içeriği yüksekten düşük düzeye doğru sıralanması **yaprak > çiçek > soğan** şeklinde bulunmuştur.

3.3. Bitki Özütlerinin FRAP Analizi

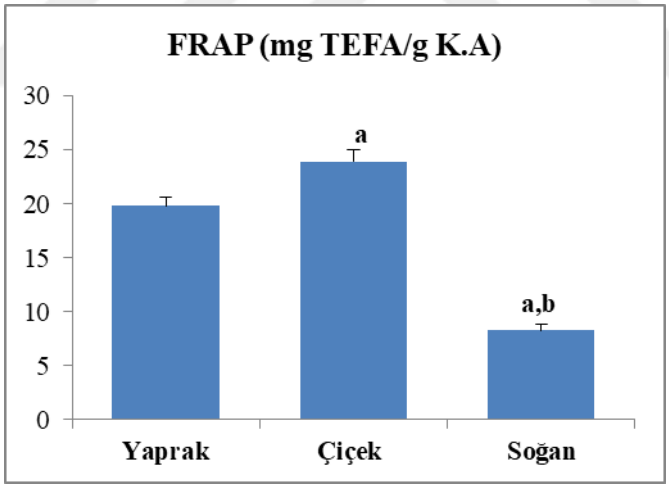
Sakarca bitkisinin yaprak, çiçek ve soğanından elde edilen özütlerin FRAP analizleri, standart madde olarak kullanılan Troloks için hazırlanan standart grafik kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Numunelerin FRAP değerleri Troloks ile karşılaştırılarak gram kuru ağırlıkta mg Troloks eşdeğer FRAP aktivitesi (mg TEFA/g K.A) şeklinde Tablo 11 ve Şekil 22'de verilmiştir.

Tablo 11. Sakarca bitkisine ait özütlerin FRAP aktivitesi

Numune (n=10)	**FRAP (mg TEFA/ g K.A)**
Yaprak	19,8 ± 0,8
Çiçek	23,9 ± 1,1 [a]
Soğan	8,3 ± 0,5 [a,b]

a: Yaprak özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Bitkinin kısımlarına ait FRAP aktivitelerinin istatistik analiz sonucunda çiçekten elde edilen özütün diğer kısımlardan elde edilen özütlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Yaprak ile soğan özütü karşılaştırıldığında ise yaprağa ait özütün FRAP aktivitesinin soğan özütüne göre fazla olduğu tespit edilmiştir. İki özüt arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı seviyede bulunmuştur (p<0,001).



Şekil 22. Sakarca bitkisine ait özütlerin FRAP aktivitesi
a: Yaprak özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Bitkinin farklı kısımlarına ait özütlerin FRAP aktiviteleri yüksekten düşük doğru sıralanması **çiçek > yaprak > soğan** şeklindedir.

3.4. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerinin CUPRAC Analizi

Bitkinin kısımlarından elde edilen özütlerde CURPAC aktivitesi troloks kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımı ile belirlenmiştir. Numunelerin CUPRAC değerleri gram kuru ağırlıktaki troloks eşdeğer CUPRAC aktivitesi (TECA/g K.A) olarak Tablo 12 ve Şekil 23'de verilmiştir.

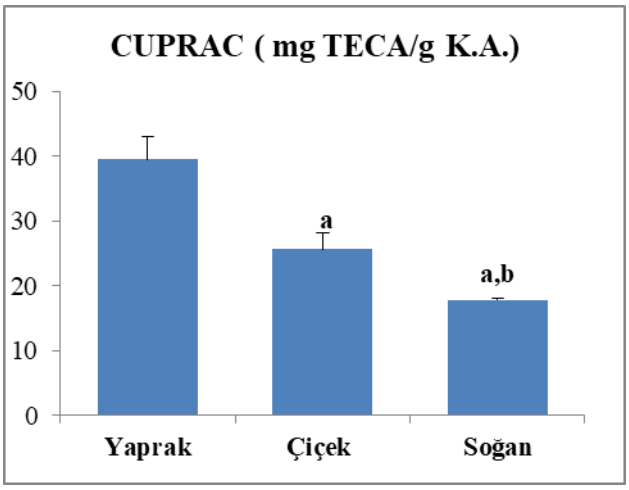
Tablo 12. Sakarca bitkisini farklı kısımlarına ait CURPAC aktivitesi

Numune (n=10)	**CURPAC (mg TECA/ g K.A)**
Yaprak	39,5 ± 3,5
Çiçek	25,6 ± 2,6 [a]
Soğan	17,8 ± 0,3 [a,b]

a: Yaprak özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

b: Çiçek özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Yapılan istatistik analiz sonucunda Sakarca bitkisinin yapraklarından elde edilen özütteki CUPRAC aktivitesi hem çiçek hem de soğan özütüne göre daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Çiçek ve soğan özütlerinin CUPRAC aktiviteleri analiz edildiğinde, çiçek özütünün soğan özütüne göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 23. Sakarca bitkisine ait özütlerin CUPRAC aktivitesi
a: Yaprak özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Özütlerin CUPRAC aktiviteleri yüksekten düşük doğru sıralanması **yaprak > çiçek > soğan** şeklindedir.

3.5. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

Bitkinin farklı kısımlarından elde edilen özütlerin DPPH radikal temizleme kapasiteleri SC_{50} olarak hesaplanmış, Tablo 13 ve Şekil 24'de verilmiştir.

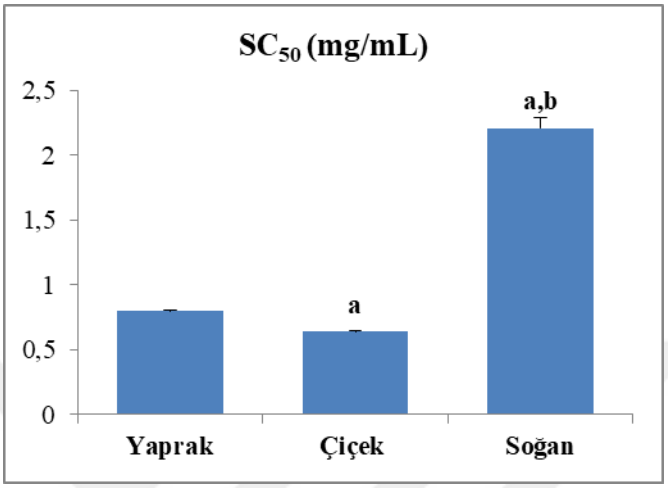
Tablo 13. Özütlerin DPPH radikal temizleme aktivitesinin SC_{50} değerleri

Numune (n=10)	**SC_{50} (mg/mL)**
Yaprak	0,8 ± 0,01
Çiçek	0,6 ± 0,01 [a]
Soğan	2,2 ± 0,08 [a,b]

a: Yaprak özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

SC_{50} değeri en düşük olan bitki özütünün DPPH radikali temizleme kapasitesinin en yüksek olduğu kabul edildiğinde, çiçeğe ait özütün SC_{50} değeri hem yaprak hem de soğan özütünün SC_{50} değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit

edilmiştir ($p<0,001$). Ayrıca yaprak ve soğan özütlerinin SC_{50} değerleri karşılaştırıldığında, yaprak özütünün SC_{50} değerinin daha düşük olduğu dolayısı ile radikal temizleme aktivitesinin de daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu iki grup arasındaki farklılıkta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 24. Özütlerin DPPH radikali temizleme kapasiteleri
a: Yaprak özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: Çiçek özütünden $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

3.6. Sakarca Bitkisine Ait Özütlerin Lipit Peroksidasyonunu Engelleme Kapasitesi

Bitkinin lipit peroksidasyonu üzerine ektisinin analizi, lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA üzerinden incelenmiştir. Hidrojen peroksit ile uyarılan oksidatif stres grubunda MDA miktarı ne kadar düşük ise bitkinin antioksidan özelliği o derece yüksektir. MDA analizi için eritrosit hücrelerine *in-vitro* olarak oksidasyon uygulanmış ve özütlerin bu oksidasyonu ne kadar engellediği tespit edilmiştir. MDA tayini yapılırken doğal standart olarak yine bitkisel bir özüt olan ve yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu literatürde yaygın olarak belirtilen Cimin üzümü kullanılmıştır. Ayrıca oksidasyon uygulanan ve uygulanmayan eritrosit ortamlarındaki MDA düzeyleri de belirlenmiştir. Bitki özütlerinin lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri Tablo 14 ve Şekil 25'de verilmiştir.

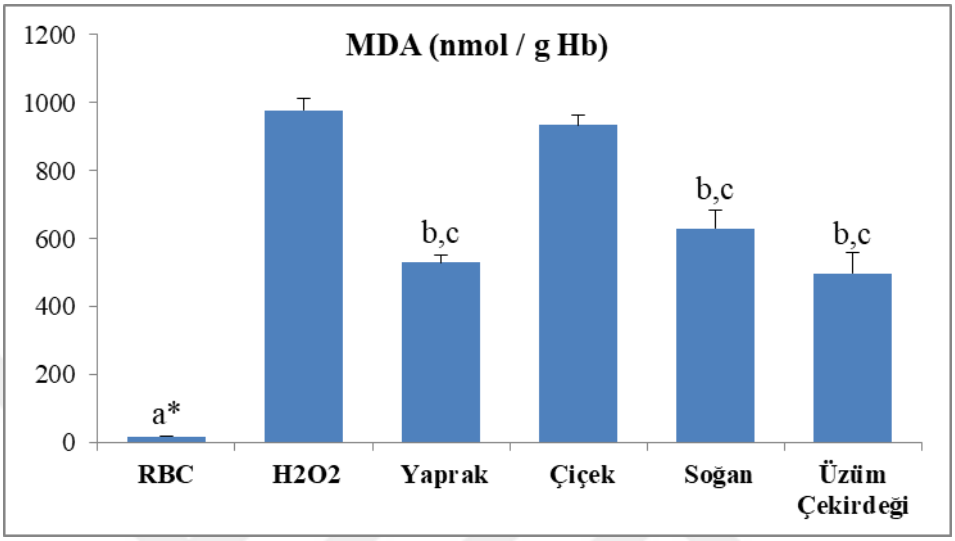
Tablo 14. Sakarca bitkisine ait özütlerin MDA düzeyleri

Numune (n=6)	**MDA (nmol / g Hb) ($\bar{x}$ ±SD)**
RBC	17 ± 2^{a}
RBC + H_2O_2	978 ± 35
RBC + H_2O_2 +Yaprak	$529 \pm 24^{b,c}$
RBC + H_2O_2 + Çiçek	934 ± 29
RBC + H_2O_2 + Soğan	$629 \pm 54^{b,c}$
RBC + H_2O_2 + Ü.Ç.	$498 \pm 61^{b,c}$

a: Diğer ortamlardan $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: RBC + H_2O_2 çalışma ortamından $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
c: Çiçek özütünün bulunduğu çalışma ortamından $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Eritrosit hücre süspansiyonunun üzerine H_2O_2 ilavesi sonucunda lipit oksidasyon gerçekleştiği, RBC ile RBC + H_2O_2 grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığın meydana gelmesi ile ortaya konmuştur. Yapılan istatistik analiz sonucunda RBC çalışma ortamının MDA düzeyinin diğer çalışma ortamlarından anlamlı seviyede daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). RBC + H_2O_2 çalışma ortamındaki MDA düzeyleri, yaprak özütü, soğan özütü ve üzüm çekirdeği özütünün bulunduğu çalışma ortamlarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek MDA konsantrasyonuna sahip olduğu ortaya konmuştur ($p<0,05$). Ayrıca RBC + H_2O_2 çalışma ortamı işe çiçek özütü bulunan deney ortamı karşılaştırıldığında, ortamların MDA düzeyleri arasında farklılık olduğu ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Çiçek özütünün bulunduğu deney ortamı yaprak, soğan ve üzüm çekirdeğinin bulunduğu çalışma ortamlarının MDA seviyeleri ile karşılaştırıldığında, her üç ortamdan da istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

Son olarak bitkinin yaprak, soğan ve üzüm çekirdeği özütlerinin MDA düzeyleri analiz edildiğinde, her bir çalışma ortamı arasında farklılık olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).



Şekil 25. Sakarca bitkisine ait özütlerin MDA düzeyleri
a: Diğer ortamlardan $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
b: RBC + H_2O_2 çalışma ortamından $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.
c: Çiçek özütünün bulunduğu çalışma ortamından $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Deney ortamlarının MDA miktarları düşükten yükseğe doğru sıralandığında **RBC < Üzüm Çekirdeği < Yaprak < Soğan < Çiçek < RBC + H_2O_2** şeklindedir.

3.7. Bitki Özütlerinin Toplam Tiyol (-SH) Düzeyleri

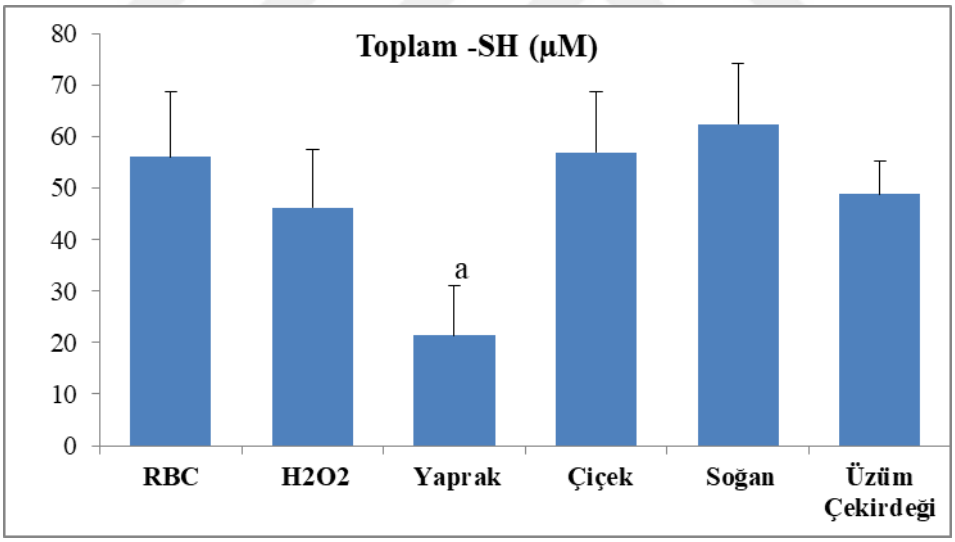
Eritrositlerde toplam –SH gruplarının miktarı, ortama H_2O_2 ilavesi ile oksidatif stres oluşturulduktan sonra özüt ilave edilerek belirlenmiştir. Özütlerin toplam –SH seviyelerine olan etkileri Tablo 15 ve Şekil 26'da verilmiştir.

Yapılan istatistik analizin değerlendirilmesi sonucunda sadece yaprak özütünün bulunduğu deney ortamında –SH gruplarının seviyesi diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer deney ortamları arasında farklılık saptanmış ancak istatistiksel olarak bu farklılığın anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 15. Eritrositlerdeki toplam –SH miktarları

Numune (n=6)	**Toplam -SH (µM Glutatyon) (x̄ ±SD)**
RBC	56 ± 12,7
RBC + H_2O_2	46 ± 11,3
RBC + H_2O_2 +Yaprak	21 ± 9,7[a]
RBC + H_2O_2 + Çiçek	57 ± 11,8
RBC + H_2O_2 + Soğan	62 ± 11,8
RBC + H_2O_2 + Ü.Ç.	49 ± 6,5

a: Diğer çalışma ortamlarından p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.



Şekil 26. Eritrositlerdeki toplam –SH miktarlarının grafiksel gösterimi
a: Diğer çalışma ortamlarından p<0,001 düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

3.8. Protein Oksidasyon Ürünü Olarak Eritrosit Ghost Protein Karbonil Miktarları

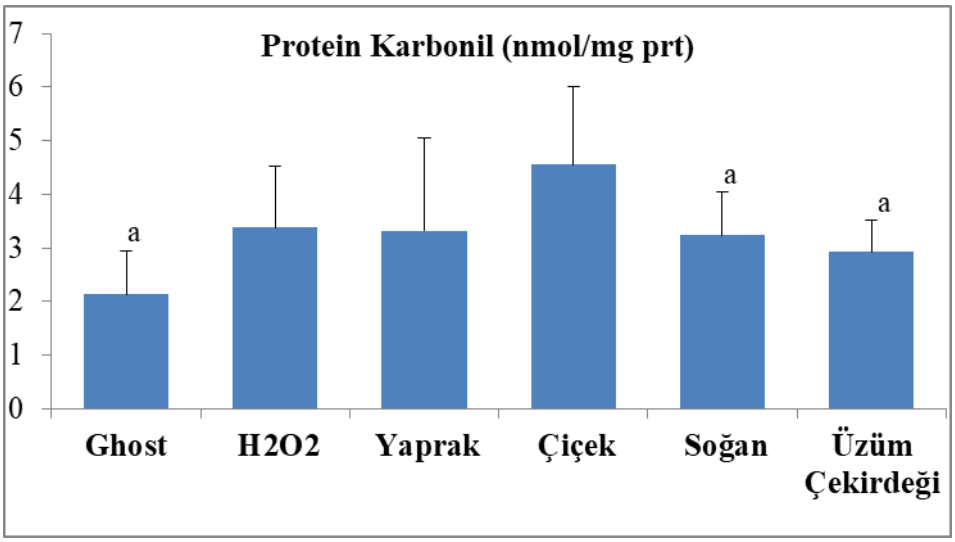
Sakarca bitkisinin farklı kısımlarına ait özütlerin protein oksidasyonu sonucu oluşan protein karbonil miktarını inhibe etme kapasitesi incelenmiştir. Protein karbonil inhibisyonu hesaplanırken oksidasyon birimi nmol protein karbonil/ mg protein olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 16'de ve Şekil 27'de verilmiştir.

Tablo 16. Eritrosit Ghost protein karbonil miktarı

Numune (n=6)	**Protein Karbonil (nmol/mg prt) ($\bar{x}$ ±SD)**
Ghost	2,3 ± 0,81[a]
Ghost + H_2O_2	3,3 ± 1,14
Ghost + H_2O_2 +Yaprak	3,3 ± 1,73
Ghost + H_2O_2 + Çiçek	4,5 ± 1,47
Ghost + H_2O_2 + Soğan	3,2 ± 0,80
Ghost + H_2O_2 + Ü.Ç.	2,9 ± 0,60 [a]

a: Diğer çalışma ortamlardan $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

Eritrosit ghost protein karbonil miktarları istatistiksel olarak analiz edildiğinde bütün deney ortamları arasında farklılık olduğu tespit edilmiştir. Ancak sadece çiçek özütünün bulunduğu çalışma ortamında protein karbonil miktarı soğan ve üzüm çekirdeği özütlerinin bulunduğu çalışma ortamından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca sadece ghost bulunan deney ortamındaki protein karbonil seviyesi çiçek özütünün yer aldığı ortamından istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p<0,001$).



Şekil 27. Eritrosit ghost protein karbonil miktarının grafiksel gösterimi
a: Diğer çalışma ortamlardan $p<0,001$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İnsanlığın varoluşundan bu yana tıbbi ve aromatik bitkilerin tedavi amaçlı ve besin kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde de gerek hastalıkların tedavisinde gerekse ortaya çıkabilecek hastalıkların önlenmesinde bitkilerden yararlanılmaya devam edilmektedir. Bu kapsamda son yıllarda bitkilerin kimyasal bileşenlerini aydınlatmaya yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre gelişmiş ülke vatandaşları başta olmak üzere 4 milyar kadar insanın sağlık sorunlarının çözümü için öncelikli olarak reçeteli ya da reçetesiz bitkisel ilaçlara yöneldiği görülmektedir. Yine Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre kayıtlı olarak 20.000 çeşit bitkisel ilaç mevcuttur. Günümüzde modern tıpta kullanılan ilaçların ilk etken maddesi de tarihteki geleneksel tıp literatürlerinden öğrenilen bitkiler olup sentetik olarak üretilerek piyasaya sürülmektedirler (Kumar, 2009). Ancak modern tıpta kullanılan sentetik ilaçların zaman zaman tedavide beklenen başarıya ulaşamamaları ve tek bir olumlu etkilerine karşılık birçok olumsuz yan etkilerinin bulunması nedeniyle geleneksel metotlar ile bitkilerin alternatif tıp adı altında tedavi edici olarak kullanılmaları yaygınlaşmaktadır (Berber vd, 2013).

Kanser, diyabet, kardivasküler sistem hastalıkları, hücre yaşlanması, DNA hasarı, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında oksidatif stresin rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Reaktif oksijen ve azot türlerinin miktarının artmasıyla oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulması durumunda ortaya çıkan oksidatif strese karşı, organizmada enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler devreye girmektedir. Mevcut antioksidan sistem diyetle alınan antioksidan içeriği yüksek besinler tarafından desteklenmektedir (Dündar ve Aslan, 1999).

Bitkilerin tedavi edici olarak tercih edilmelerini sağlayan etmen içeriklerindeki fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Daha önce yapılan çalışmalar bu bileşiklerin antioksidan, anti-inflamatuvar, antialerjik, antimikrobiyal ve anti-kanserojen özelliklerinin olduğunu ortaya koymuştur.

Ülkemiz gerek coğrafi konumu gerekse iklim özelliklerinin bir sonucu olarak çok sayıda bitki türüne ev sahipliği yapmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler özellikle Ege, Doğu Karadeniz, Akdeniz, Marmara ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yetişmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğu, 2011). Antioksidan özelliği bilinmeksizin birçok bitkinin gıda

olarak oldukça sık tüketildiği yerlerden biri olan Giresun, ülkemizde ortalama yaşam süresinin en uzun olduğu il olarak da dikkat çekmektedir (TÜİK, 2014). Teze konu olan Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) bitkisi de özellikle Doğu Karadeniz bölgesinde fındık bahçelerinde doğal olarak yetişmekte ve yenilebilir yabani bitkilerden olup Ordu-Giresun yöresinde, soğanları ve toprak üstü kısımları pişirilerek yöre halkının sofralarında yer almaktadır. Yapılan literatür taramasında Sakarca bitkisi ile ilgili TFMM, TFM ve DPPH radikal temizleme aktiviteleri dışında başka çalışma yapılmadığı görülmüştür.

Tez kapsamında Sakarca bitkisinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bitkinin yaprak, çiçek ve soğan kısımları ayrılarak metanollü özütleri hazırlanmıştır. Bu özütlerde; toplam fenolik madde miktarı tayini (TFMM), toplam flavonoid miktarı tayini (TFM), FRAP ölçümü, CUPRAC tayini, DPPH radikali temizleme aktivitesi ile özütle muamele edilmiş ve edilmemiş eritrositlerde; lipit peroksidasyon son ürün (MDA) oluşumu, Toplam Tiyol (-SH) düzeyi ve protein karbonil seviyeleri çalışılmıştır.

Bu çalışmada öncelikle Sakarca bitkisinin farklı dokularına ait özütlerin TFMM düzeyleri ölçülmüştür. Standart olarak gallik asit kullanılmış ve özütlerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit eşdeğer gram kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Tayin sonucunda; özütler kendi aralarında karşılaştırıldığında en fazla fenolik madde miktarı yaprakta daha sonra çiçek ve soğanda belirlenmiştir. Bu sonuçların Apaydın ve Yolcu'nun Sakarca üzerinde aynı metotla yaptığı toplam fenolik madde miktarı sonuçları ile uyumlu olmakla birlikte, fenolik maddelerin özellikle yaprak kısmında daha fazla olduğu görülmüştür. Adawia ve ark. Suriye İdlib bölgesinde yetişen *Ornithogalum umbellatum* bitkisinde TFMM tayini yapmış; bitkiyi soğan ve toprak üstü olmak üzere iki kısıma ayırarak analiz etmiş ve toprak üstü TFMM'yi daha yüksek (23 mg GAE/ g KA) bulmuşlardır. Tez çalışmasında elde edilen TFMM bulgularının Adawia ve ark. sonuçları ile birebir (21,5 mg GAE/ g KA) uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak Demirkol ve arkadaşlarının Ordu yöresinden temin edilen Sakarca bitkisiyle yaptığı çalışma ile karşılaştırıldığında bizim belirlediğimiz toplam fenolik madde miktarlarının daha az olduğu görülmüştür. Rat ve ark. yapmış olduğu çalışmada farklı yetişme koşullarında (habitat) bitkinin TFMM, TFM ve DPPH radikal temizleme aktivitelerinin değiştiğini bildirmişlerdir. Demirkol ve ark. ile bu çalışma sonuçları arasındaki farklılığın bitkinin yetişme koşullarının, çalışmada kullanılmak üzere toplanma zamanlarının ve özütleme işleminde kullanılan çözeltinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Standart olarak kuersetin kullanılarak yapılan çalışmamızda TFM sonuçları mg kuesertin eşdeğer gram kuru ağırlık şeklinde ifade edilmiştir. En fazla flavonoid miktarı sırasıyla yaprak, çiçek ve soğanda belirlenmiştir. Sonuçların Apaydın ve Yolcu'nun Sakarca bitkisi ile yaptıkları çalışmadaki toplam flavonoid miktarları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Adawia ve ark. yapmış olduğu çalışmada toprak üstü kısımların soğana göre daha fazla TFM sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ancak toprak üstü kısımların TFM'yi, tez çalışmamızda belirlediğimiz TFM'den daha yüksek miktarda tespit etmişlerdir. Bunun sebebinin kullanılan standart maddenin ve yine yetişme koşullarının farklılığından kaynaklananabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada özütlerin toplam antioksidan kapasiteleri FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile belirlenmiştir. Özütler, Troloks ile karşılaştırılarak gram kuru ağırlıkta mg Troloks eşdeğer FRAP aktivitesi ve troloks eşdeğer CUPRAC aktivitesi şeklinde ifade edilmiştir. Özütler kendi aralarında karşılaştırıldığında FRAP aktivitesinin belirgin bir şekilde en fazla çiçekte olduğu, en düşük aktivitenin ise soğanda olduğu görülmüştür. FRAP yönteminin sadece demir iyonunu temel alan bir yöntem olduğu göz önünde bulundurulduğunda antioksidan aktivite yönünden tek başına bu yöntemle değerlendirilme yapılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir. Özütlerin CUPRAC aktivitelerine bakıldığında TFMM ve TFM ile uyumlu olarak en yüksek aktivitenin yaprakta olduğu, daha sonra sırasıyla çiçek ve soğanda olduğu görülmüştür. CUPRAC yöntemi ile gallik asit, kuersetin, askorbik asit gibi bileşiklerin aktiviteleri kısa sürede belirlenebilirken daha karmaşık yapılı bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesi için yaklaşık 30-60 dakikaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda çiçekte FRAP aktivitesinin daha yüksek çıkıp CUPRAC aktivitesinin yaprağa göre düşük çıkmasının nedeni olarak içeriğindeki antioksidan maddelerin daha karmaşık yapıya sahip olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca en sık kullanılan PubMed, Google Scholar ve Web of Science da yapılan litaratür taramasında *Ornithogalum umbelletum* bitkisinin FRAP ve CURPAC aktivitesini belirlendiği çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar karşılaştırılamamıştır.

Özütlerin DPPH radikali temizleme aktivitesinin tayininde standart olarak antioksidan özellik gösteren sentetik bir madde olan BHT kullanılmıştır. DPPH radikalinin yarısını temizleyen konsantrasyonlara (SC_{50}) bakıldığında; FRAP aktivitesinde olduğu gibi en yüksek temizleme aktivitesinin de belirgin bir şekilde çiçekte ortaya çıktığı görülmüştür. Yaprak ve soğan özütleri karşılaştırıldığında, yaprağın DPPH radikal

temizleme aktivitesinin soğandan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Adawia ve ark. yapmış olduğu çalışmada yine toprak üstü kısmın daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da en düşük aktivite soğanda tespit edilmiş olup sonuçlar Adawia ve ark. bulguları ile uyumludur.

Çalışmada serbest radikallerin ortamda özüt varlığı ile ilişkili olarak hücresel hasar düzeylerini incelemek amacıyla hücre modeli olarak eritrositler kullanılmıştır. Eritrositler; zar yapılarında yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitlerini bulundurmaları, yüksek konsantrasyonda oksijen taşımaları, yapısında hemoglobine bağlı demir gibi geçiş metallerine sahip olmaları ve basit bir hücre yapısına sahip olup meydana gelen hasarı bertaraf edememelerinden dolayı hücresel oksidatif stres modellerinde oldukça yaygın olarak tercih edilmektedir (Gaetani vd, 1989). Oksidatif stres oluşturmak amacıyla hücreler H_2O_2'e maruz bırakılmıştır. Stres oluşturmak amacıyla H_2O_2'in seçilmesinin nedeni hidrojen peroksidin hemoglobinin oksidasyonuna yol açmasının yanı sıra bilinen en zararlı radikallerden hidroksil radikalinin oluşumuyla sonuçlanan Haber-Weiss reaksiyonunu doğrudan etkilemesi ve Fenton reaksiyonunu hemoglobindeki demirin salınmasını uyararak dolaylı olarak etkilemesidir (Stocks ve Dormandy, 1971).

Yapılan literatür taramalarında oksidatif stres oluşturmak için ortama eklenen H_2O_2 konsantrasyonunun 0,2-735 mM arasında geniş bir aralıkta olduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılmak üzere ideal H_2O_2 konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 5-10-20-30-40-50 - 100 mM'lık konsantrasyonlar denenmiştir. 5 ve 10 mM'lık H_2O_2 konsantrasyonlarının stres oluşturmada yetersiz kaldığı görülmüş ve 20 mM üzerindeki konsantrasyonların arasında oldukça az fark olmasından dolayı çalışmalarda kullanılacak ideal H_2O_2 konsantrasyonu 20 mM olarak belirlenmiştir (Ek 1). Buna göre 20 mM'lık H_2O_2, çalışma ortamına eklenerek eritrositler hasara uğratılmıştır. Çalışmalarda kullanılacak özüt miktarlarının belirlenmesi amacıyla, özütün hem antioksidan hem de prooksidan aktivite yönünden davranışı incelenmiştir. Kuru gram ağırlık cinsinden 1-2-3-4-5 mg/mL'lik özütler karşılaştırıldığında antioksidan etkinin 2 mg/mL'lik konsantrasyonda görülmeye başlandığı, konsantrasyon arttıkça antioksidan etkinin arttığı belirlenmiştir (Ek 2). Ancak prooksidan etkilerine bakıldığında 2 mg/mL'lik özüt konsantrasyonu % 60 prooksidan etki gösterirken 3 mg/mL'lik özüt konsantrasyonu % 126 prooksidan etki gösterdiği ve konsantrasyon artıkça prooksidan etkinin arttığı belirlendiği için çalışmalarda kullanılacak özüt konsantrasyonu 2 mg/mL olarak seçilmiştir (Ek 3). Çalışmada standart olarak antioksidan özelliği yüksek

olduğu literatürdeki birçok çalışmada teyit edilmiş, doğal bir bitkisel antioksidan olan üzüm çekirdeği kullanılmıştır (Ekinci, 2008). MDA miktarı, toplam tiyol (-SH) düzeylerinin belirlenmesi ve eritrosit protein karbonil miktarlarının analizi yapılan taramaya göre karar verilen değerlerde incelenmiştir.

Hücrelerde meydana gelen serbest radikaller zar fosfolipitlerinde çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) ile etkileşerek kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyon olan lipit peroksidasyonuna yol açarlar. Lipit peroksidasyonu hücre zar yapısını ve geçirgenliğini bozarak hücrelerde ciddi hasar oluşturur. Hücresel çalışma modelinde ilk olarak, ÇDYA'inde meydana gelen oksidatif hasarı gösteren kararlı ve son ürün olan MDA miktarına bakılmıştır. Sakarca bitkisinin yaprak özütlerinin bulunduğu deney ortamında MDA miktarının çiçek ve soğan özütlerinin bulunduğu deney ortamlarına kıyasla daha az olduğu görülmüş, benzer şekilde yaprak özütünün TFMM, TFM ve CUPRAC aktivitelerinin de yüksek olması yaprak özütlerinin antioksidan özelliğinin çiçek ve soğandan daha fazla olabileceğini düşündürmüştür. MDA düzeylerini azaltmasında en az etkinin çiçekte olduğu görülmüştür. Üzüm çekirdeği ile karşılaştırıldığında Sakarca bitkisinin kendi içindeki en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu düşünülen yapraktaki antioksidan aktivitenin, üzüm çekirdeğinden daha az olduğu tespit edilmiştir.

Tiyol grupları hücrenin redoks dengesinin korunmasında en etkili kimyasal gruplardan biridir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Özellikle indirgenmiş glutatyon şeklinde hücre yapısında yer alırlar. Proteinlerdeki sistein amino asit kalıntıları da aynı koruyucu işleve sahiptir. Özellikle hücre zarında yer alan proteinler tiyol gruplarınca zengindir. Toplam tiyol düzeylerinin belirlenmesi peptit (GSH) ve protein sülfhidril gruplarının toplamını ifade etmektedir. İndirgenmiş glutatyonun (GSH) H_2O_2 kaynaklı oksidatif strese ve diğer serbest radikallerin sebep olduğu hasara karşı savunmada önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Aksoy, 2002). Oksidatif stres ile toplam tiyol düzeylerinin azaldığı yapılan literatür taramalarından bilinmektedir.

Çalışmada eritrositlerdeki toplam -SH düzeylerinin analizinde; soğan ve çiçek özütünün bulunduğu deney ortamında toplam –SH grup düzeyinin yaprak özütünün bulunduğu deney ortamlarına göre anlamlı seviyede daha yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar çiçek ve soğan içeriklerinin oksidatif strese karşı verilen hücresel cevabın bir oyuncusu gibi davranabileceği ve dolayısıyla hücresel tiyol gruplarının korunmasına neden olabileceğini düşündürmektedir**.** Diğer gruplar arasında anlamlı bir

fark görülmemekle birlikte en yüksek –SH grubu düzeyi soğanda tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında Sakarca bitkisinin hücresel ortamda –SH grubu düzeyindeki etkilerine yönelik bir çalışmaya rastlanamadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

Biyolojik membranlar protein yönünden de oldukça zengindir. Protein oksidasyonu ROT ile doğrudan ($OH^{\cdot}$, H_2O_2) veya oksidatif stresin sekonder ürünleri (MDA) ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonları olarak tanımlanır (Gülbahar 2007). Proteinlerin oksidatif hasarının bir sonucu olarak protein karbonil grubu oluşur. Lipit ve karbohidrat oksidasyonu sonucunda oluşan ürünler protein karbonil oluşumunun sekonder sebebi olarak kabul edilmektedir. Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyi sakarca bitkisine ait özütlerin kullanıldığı deney ortamında en fazla çiçek özütünün olduğu ortamda tespit edilmiştir. Çalışmada özütlerin protein oksidasyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla protein karbonil oluşumunu baskılama kapasitesi incelenmiştir. Protein karbonil miktarları, çiçek özütünün bulunduğu ortamda diğer çalışma ortamlarından daha yüksek tespit edilmiştir. Bunun sebebinin lipit peroksidasyonu sonucunda meydana gelen MDA'dan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çiçek özütünün bulunduğu çalışma ortamında protein karbonil miktarı soğan ve üzüm çekirdeği özütlerinin bulunduğu çalışma ortamından anlamlı düzeyde daha yüksek bulunsa da antioksidan özellik yönünden toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid miktarı ile karşılaştırıldığında sonuçlar uyumlu değildir.

Sonuç olarak, Sakarca bitkisi ile yapılan analizler sonucunda TFMM, TFM, CUPRAC aktiviteleri yüksekte düşüğe doğru sıralandığında yaprak > çiçek > soğan şeklinde bulunmuştur. FRAP ve DPPH radikal temizleme aktivitesinde ise sıralama çiçek > yaprak > soğan şeklinde tespit edilmiştir. Ancak hücresel ortamda Sakarca bitkisine ait özütlerin gösterdiği etkilerde farklılıklar meydana geldiği belirlenmiştir.

Bu farklılıkların sebebini tartışmak için sakarca bitkisi ile ilgili litaretür taraması yapılmıştır. En sık kullanılan PubMed, Google Scholar ve Web of Science arama motorlarında yapılan taramada *Ornithogalum umbelletum* bitkisinin hücresel ortamdaki etkileri ile ilgili litatarüre rastlanmadığından karşılaştırma yapma olanağı bulunamamıştır.

Özellikle Giresun ve Ordu yöresinde yaygın olarak mutfaklarda kendine yer bulan ve gıda olarak tüketilen bu bitkinin antioksidan etkisi açısından çarpıcı bir özelliğinin bulunmadığı (üzüm çekirdeğine kıyasla) söylenebilir. Teze konu olan bitkinin oksidatif

stres oluşturulan ortamdaki etkisinin incelenmesi açısından literatürdeki ilk çalışma olduğu söylenebilir.

5. ÖNERİLER

1. Özütleme işleminde farklı çözeltiler kullanılarak elde edilen bitkinin farklı çözeltili özütlerinde TFMM, TFM, DPPH aktivitesi ve diğer antioksidan yöntemler yapılabilir. Böylece daha verimli sonuçlar elde edilebilir.

2. Yapılan çalışmalarda özütlerin fenolik içerikleri ile lipit ve protein oksidasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir, bunlara ek olarak özütlerin oksidatif strese uğratılan hücresel ortamda karbohidrat ve nükleik asitler üzerinde meydana gelen hasarı baskılama kapasiteleri incelenebilir.

3. Özütlerin ayrı ayrı antioksidan enzim (CAT, SOD, GR, GSH-Px) aktiviteleri incelenerek antioksidan kapasiteleri mevcut çalışmalarla daha sağlıklı bir şekilde karşılaştırılabilir.

4. HPLC kullanılarak, özütlerin fenolik bileşikler yönünden içerikleri aydınlatılabilir.

5. Yapılan çalışmaların tamamı spektrofotometrik olarak manuel yapılmış olup, bu çalışmalar HPLC ile gerçekleştirilerek hem zamandan tasarruf edilebilir hem de daha verimli sonuçlar elde edilebilir.

6.Özütlerin hücredeki vitamin düzeylerine olan etkisi incelenerek antioksidan aktivitesi karşılaştırılabilir.

7. Çalışma deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilerek in vivo şartlarda elde edilen bulgularla mevcut sonuçlar karşılaştırılabilir.

KAYNAKLAR

Adawia K, Rawaa AK, Ghalia S. 2016. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selected Wild Plants in Liliaceae Family Growing Syria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 8: 2025-2032.

Aikens J, Dix T. 1991. Perhydroxyl Radical İnitiated Lipid Peroxidation. The Role Of Fatty Acid Hydroperoxides. J. Biol. Chem., 266(23), 15091-8.

Akkuş İ. 1995. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza yayınları, Konya, 1-28.

Aksoy Y. 2002. Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. T Klin Tıp Bilimleri. 22: 442-448.

Albayrak S, Aksoy A, Sağdıç O, Hamzaoğlu E. 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. Food Chemistry 119: 114-122

Altınışık M. 2000. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi,Biyokimya Anabilimdalı. Aydın.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method**.** . *Agric. Food Chem*. 52,26 : 7970-7981

Apaydın E, Yolcu M. 2017. Giresun Yöresine Ait Sakarca (*Ornithogalum Umbellatum L.*) Bitkisinde Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavonoid Madde ve İyon Kromatografik Anyon-Katyon İçeriklerinin Tayinleri. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi 7: 152-160

Bayram ÖS, Bayram Ö, Valerius O, Park HS, Irniger S, Gerke1 J, Ni M, Han K, Yu JH, Braus GH. 2010. LaeA Control of Velvet Family Regulatory Proteins for Light-Dependent Development and Fungal Cell-Type Specificity. Plos Genetics 6(12): e1001226. doi:10.1371.

Benzie FF, Strain JJ. 1999. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology. 299: 15-27.

Beutler E, Robson MJ, Buttenwieser E. 1957. The Glutathione Instabilityof Drug Sensivity Red Cells. J Lab Med. 49- 84.

Bilaloğlu GV, Harmandar M. 1999. Flavonoidler, Bakanlar Matbaacılık Ltd. ŞTİ., İstanbul, 336.

Boots AW, Haenen GMMR, Bast A. 2008. Health effect of quercetin: from antioxidant to nutracuetical. Europan Journal of Pharmacology 585: 325-337.

Borek, C. 1987. Radiation and Chemically Induced Transformation: Free Radicals, Antioxidants and Cancer. 55:74-86.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Burtis CA, Ashwood ER. 2005. Vitaminler. Çeviren: Aslan D. EDS. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Palme Yayınları, Ankara.

Büyükgüzel E, Büyükgüzel K, Snela M, Erdem M, Radtke K, Ziemnicki K, Adamski Z. 2013. Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. Cell Biology and Toxicology 29: 117–129

Cankurtaran M. 2005. Yaşlılık, yaşlanma mekizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. 7. Ulusal iç hastalıkları kongresi, kongre kitapçığı. 1-5.

Canoruç N, Çiçek R, Atamer A, Dursun M, Turgut C, Güneli E, Canoruç F. 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stres-induced ulcer formation in rats. Turk J. Med. Sci., 31, 199-203.

Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. 2004. Oxidative stres in autism: İncreased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferin –the antioxidant proteins. Life Sciences 75: 2539-2549.

Clemens MR, Waller HD. 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. Chemistry and Physics of Lipids. 45: 251-268

Comporti M. 1993. Lipid peroxidation. Biopathological signi ficance. Molce.Aspeels.Med. 14: 199-207.

Costello FG, Webber A. 1990. White cell function in Down's syndrome: Increased enzymatic antioxidative defense is accompanied by decreased superoxide anion generation in blood. Hereditas., 113, 73-75.

Cross, C.E., Hallıvel, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Soul, R.L., Mccard, J.M., Harman, D., 1987. Oxygen radicals and human disease. Annal. İntern. Med., 107:526-545.

Cuedent M, Hostettmann P, Potterat O. 1997. İridoid Glucosides with Free Radical Scavening Proporties from Fragraea blumei. Helv. Chim. Acta. 80: 1144-1152.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups is biomarkers of oxidative stres. Clinica Chimica Acta 329: 23-38.

Dean N, Zhang YB, Poster JB. 1997. The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 272(50):3190814

Demirkol M, Çelik ÖF, Tarakçı Z. 2017. Ordu İlinde Yetişen Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) Bitkisinin Antibakteriyel Aktivitesi ve Toplam Fenolik Madde İçeriği. Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi 7: 312-318.

Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. 1963. The preperation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 100: 119-130.

Dündar Y, Aslan R. 1999. Oksidan-Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. Hayvancılık Araştırma Dergisi 9: 32-39.

Efe H. 1996. Hiperlipoproteinemililerde Plazma, Eritrosit, Lenfosit ve Nötrofil Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Lipid Peroksidasyonu ve Çeşitli Lipid Parametreleriyle İlişkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 138s.

Ekinci AP. 2008. Erzincan Üzümünün (*Vitis vinifera spp., Cimin*) Farklı Dokularına Ait Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin İn Vitro İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.

Esterbauer H, Wag G, Puhl H. 1993. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br. Med. Bull., 49(3), 566-76.

Evans DR, Myles T, Hofsteenge J, Hemmings BA. 1999. Functional expression of human PP2Ac in yeast permits the identification of novel C-terminal and dominant-negative mutant forms. *J Biol Chem* 274(34):24038-46

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

Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanımı ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi. 11: 52-67.

Flora SJ. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell. Mol. Biol. 53(1), 1-2.

Fridovich I. 1975. Superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem., 44, 147-159.

Gaetani GF, Galiano S, Caanepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood. 73: 334-339.

Gözükara EM. 1997. Biyokimya. Evin Matbaası, İstanbul.

Guliyev V, Harmandar M. 2000. Flavonoidler, Aktif Yayınevi, İstanbul.

Gutteridge JMC. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry 41: 1819-1828.

Gülbahar Ö. 2007. Protein oksidasyonun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. Turk. J. Geriatrics. 10: 43-48.

Halifeoğlu İ, Canatan H, Üstündağ B, İlhan N, İnanç F. 2000. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. Cell Biochem. Funct., 18(4), 263-267.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1985. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Journal Biochemistry 219: 1-14.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford Universty Press. New Yortk, 10-121.

Hawkins CL, Davies MJ. 1998. Degradation of hyaluronic acid, poly-and monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. Free Radical Biyology And Medicine 24:1396-1410.

Hawkins CL, Davies MJ. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. Biochim. Biophys. Acta., 1504 (2-3): 196-219.

Hevia D, Mayo JC, Tan DX, Rodriguez-Garcia A, Sainz RM 2012. Melatonin enhances photo-oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by an antioxidant reaction that renders N1 Acetyl-N2-Formyl-5-Methoxykynuramine (AFKM). Plos One 9:109-257.

Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. CRC Cirit. Rev. Tox., 18, 27-69.

Hugo EA. 1983. Catalase. Bergmeyer Methods of Enzymatic Analysis, 3. Volume, Third Ed. V.C.H. Pub., G.B, 273-285.

Kan Y, Arslan N. 2001. *Datura stramonium* L'nin botanik varyetelerinin farklı organlarının total alkaloit miktarları ve verimi yönünden karşılaştırılması. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi 30: 1-11.

Karabulut H, Gülay MŞ. 2016. Serbest radikaller.Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4: 50-59.

Kılınç K, Kılınç A. 2002. Oksijen toksisitesinin araç molekülleri olarak oksijen radikalleri.
Hacettepe Tıp Dergisi 33: 110-118.

Koçyiğit, M. 2005. Yalova ilinde etnobotanik bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul.

Kumar AN, Aruna P, Naidu JN, Kumar R, Srivasta A. 2015. Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant. Archives Medical Review Journal 24: 19-40.

Lewin, R. 2000. Modern İnsanın Kökeni, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Çeviri: N. Özüaydın, 7. basım, TÜBİTAK, Ankara.

Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. Amerikan Society for Nutritional Sciences 134: 3479-3484.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: İmpact on human health. Pharmacognosy Reviews 4: 118-126.

Meram İ, Aktaran Ş. 2002. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri Arşiv, 11,299– 304.

Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Mille R, Cannon JG, Morrow FD, Rocklin R, Blumberg JB. 1990. Vitamin E supplementation enhances cell mediated immunity in healthy elderly subjects. A. J. Clin. Nutr., 52, 557-563.

Miser E. 2011. Çeşitli bitkisel halk ilaçlarının antioksidan aktivite yönünden değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Sağlı Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem. 279(47), 49064-49073.

Murray RK, Granner DK, Mayes RA, Rodwell VW. 1996. Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. Harper'ın Biyokimyası, 24. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.

Rat MM, Gavaric NS, Kladar NV, Andric AM, Anackov GT, Bozin BN. 2016. The Phenolics of the *Ornithogalum umbellatum L.* (Hyacinthaceae):Phytochemical and Ecological Characterization. Chem. Biodiversity. 13: 1551 – 1558

Sen S, Chakraborty R. 2011. The role of antioxidants in human health. American Chemical Society 1: 1-37.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C. 2010. Free radicals, antioxidants, d,seases and phytomedicines: Current status and future prospect.İnternational Journal of Pharmacuetical Science and Research 3: 91-100.

Seven A, Candan G. 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 27: 41-50.

Shahidi F, Naczk M. 1995. Food phenolics. A Technomic Publication, USA.

Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult 28: 49-55.

Stefanis L, Burke RE, Greene LA. 1997. Apoptosis in neurodegenerative disorders. Current Opinion in Neurology 10: 299-305.

Stocks J, Dormandy TL. 1971. The Autoxidation of Human Red Cell Lipids Induced by Hydrogen Peroxide. British Journal of Haematology. 575.

Tan, A. 1992. Türkiye'de bitkisel çeşitlilik ve bitki genetik kaynakları. J. of AARI, 2: 50-64.

Tevfik Ö 2010. Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. Grasas Y Aceites 61: 86-94.

Uchida K. 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovasculer diseases. Free Radical Bio. Med., 28, 1685–1696.

URL-1, 2019. https://docplayer.biz.tr/49896941-Serbest-radikallerin-etkileri-ve-olusum-mekanizmalari.html (10 Mayıs 2019)

URL-2, 2019. https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=51424 (12 Mayıs 2019)

URL-3, 2014. https://www.okurvegezer.com/sakarca-ornithogalum-umbellatum/ (20 Şubat 2019)

URL-4, 2013. http://sifalibitkilerr.blogspot.com/2013/01/sakarca-bitkisi.html (20 Şubat 2019)

Uzun K, Vural H, Öztürk T, Özer F. 2000. İmecik, İ. Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. East. J. Med., 5(2), 48-51.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. 2007. Fre radicals and antioxidants in normal physioogical functions and human disease. The İnternational Journal of Biochemistry Cell Biology 39: 44-84.

Vander Zee T, Dubbelman MAR, Van Steveninck J. 1985. Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 818: 38-44

Yılmaz N, Deveci M, Dede Ö & Şekeroğlu N. 2004. Ordu ve Giresun illerinde doğal olarak yetişen tıbbı ve aromatik bitkilerin tespiti, kullanılma alanları ve yetişme koşullarının belirlenmesi. *Üçüncü Milli Fındık Şurası (Bildiri kitabı),* 10-14 Ekim 2004, Sayfa: 432-447, Giresun.

Yılmaz S, Ozan ST. 2003. Meme Kanserli Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Türk Biyokimya Dergisi 28: 252-256.

Young IS, Woodside JV 2001. Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology 54: 176-186.

EKLER

Ek 1. Hidrojen peroksit konsantrasyon taraması

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Ortalama	SD
RBC	14	16	11	19	11	22	12	12	9	8	**14**	4
100 mM H_2O_2	720	795	824	910	923	926	935	844	941	709	**853**	81
50 mM H_2O_2	729	721	812	801	907	890	916	833	807	622	**804**	84
40 mM H_2O_2	846	846	698	746	855	938	909	898	796	740	**820**	81
30 mM H_2O_2	845	846	822	645	779	879	901	920	722	786	**815**	83
20 mM H_2O_2	798	766	734	744	644	661	747	753	476	690	**701**	77
10 mM H_2O_2	182	146	163	160	93	76	90	96	74	73	**115**	41
5 mM H_2O_2	43	61	60	57	64	40	44	54	39	34	**50**	10

Ek 2. Farklı özüt konsantrasyonlarının antioksidan etkileri

	1.	2.	3.	4.	Ortalama	SD
RBC	16	13	12	12	**14**	1
5 mg/mL	205	204	222	236	**217**	15
4 mg/mL	213	220	232	249	**229**	16
3 mg/mL	291	285	304	317	**300**	14
2 mg/mL	366	374	369	395	**376**	12
1 mg/mL	567	566	568	613	**579**	22
RBC+H_2O_2	721	720	727	789	**740**	33

Ek 3. Farklı özüt konsantrasyonlarının prooksidan etkileri

	1.	2.	3.	4.	Ortalama	SD
RBC	9	10	9	10	**10**	0,5
5 mg/mL	31	32	27	28	**30**	2
4 mg/mL	26	27	21	22	**25**	2
3 mg/mL	28	27	19	20	**24**	4
2 mg/mL	18,3	20	13	14	**17**	3
1 mg/mL	14	15	13	12	**14**	1
RBC+H_2O_2	787	798	787	798	**793**	6

ÖZGEÇMİŞ

Eda YILMAZ, 08.12.1993 tarihinde ARTVİN ili Arhavi ilçesinde doğdu. İlköğretimini 2007 yılında Artvin Arhavi Atatürk İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2011 yılında Artvin Arhavi Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2011 yılında başladığı lisans eğitimini 2016 tarihinde Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nde tamamladı. 2016 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Bölümü'nde başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.