



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

FENOLİK BİLEŞİKLERİN PROOKSIDAN AKTİVİTELERİNİ
ALGILAMAK İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Esin AKYÜZ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN

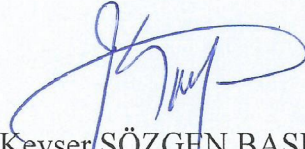
II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Esma TÜTEM

Ekim, 2017


İSTANBUL

Bu çalışma, 20.10.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



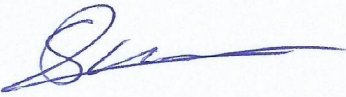
Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



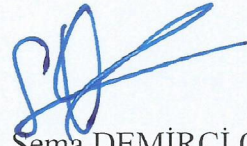
Prof. Dr. M. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



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



Prof. Dr. Süleyman AKMAN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim süresince çalışmalarına özveriyle katkıda bulunan, her sorunumla hoşgörülle yakından ve içtenlikle ilgilenen, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok değer verdiğim hocam doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN' a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve akademik tecrübelerinden yararlandığım, hoşgörü ve samimiyetiyle örnek teşkil eden ve aynı zamanda doktora II. tez danışmanım olan çok değerli ve sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Esmâ TÜTEM' e en içten dileklerle şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, yüksek lisans tez danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Reşat APAK' a doktora ve yüksek lisans öğrenimim süresince ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme jürisinde yer alan hocam Sayın Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK' e tez çalışmalarına verdiği katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Akademik kariyerim ve çalışmalarım süresince her zaman yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. S. Esin ÇELİK' e, Yrd. Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER' e, Yrd. Doç. Dr. Mustafa BENER' e, Uzm. Ayşe Nur ÖNEM' e, Seda ÖZEN' e, Merve AKYÜZ' e ve Furkan Burak ŞEN' e içtenlikle teşekkür ederim.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma her türlü desteklerinden ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Aldığım her kararda yanımda olan canım eşim İsmail AKYÜZ' e ve tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiren aileme yardımları, gösterdikleri hoşgörü ve sabırları için yürekten teşekkür ederim.

Ekim 2017

Esin AKYÜZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1.SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES.....	4
2.2.ANTİOKSİDANLAR	5
2.2.1.C Vitamini	6
2.2.2.Polifenolik Bileşikler.....	7
2.3.ANTİ- VE PROOKSİDAN AKTİVİTE	14
2.4.METALLERİN PROOKSİDAN AKTİVİTEDEKİ ROLÜ	18
2.5.PROTEİN OKSİDASYONU	22
2.6.PROTEİN ÇÖKTÜRME TEKNİKLERİ.....	25
2.7.PROOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....	26
2.7.1.Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi	26
2.7.2.Karbonil Tayini Yöntemi	27
2.7.3.ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi.....	27
2.7.4.Etidyum Bromür (EB) Yöntemi	28
2.7.5.Batokuproin Disülfonat (BCS) ve Batofenantrolin Disülfonat (BPS) Yöntemleri	28
2.7.6.Pirogallol Yöntemi	29
2.8.FENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN VE PROOKSİDAN ÖZELLİKLERİ HAKKINDA ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	29
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	35
3.1.KULLANILAN CİHAZLAR.....	35
3.2.KİMYASAL MADDELER	35

3.3.ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	35
3.4.ÇALIŞILAN ÖRNEKLER	36
3.4.1.Sentetik Karışımlar	36
3.4.2.Gerçek Örnekler	37
3.5.PROTEİN ESASLI KATI PROOKSİDAN SENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI.....	37
3.6.UYGULANAN PROOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ	38
3.6.1.Biyosensör Esaslı Cu(II)-Neokuproin Yöntemi	38
3.6.2.Biyosensör Esaslı Fe(III)-Ferrozin Yöntemi	40
3.6.3.Modifiye Karbonil Tayini Yöntemi.....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1.KATI BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI İŞLEMİNİN OPTİMİZASYONU	43
4.2.OPTİMUM İNKÜBASYON SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ	43
4.2.1.Biyosensör Esaslı Cu(II)-Neokuproin Yöntemi için Süre Çalışması	43
4.2.2.Biyosensör Esaslı Fe(III)-Ferrozin Yöntemi için Süre Çalışması.....	45
4.3.UYGULANAN PROOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİNİN ANALİTİK PERFORMANSLARI.....	46
4.4.SENTETİK KARIŞIMLARIN TOPLAM PROOKSİDAN AKTİVİTELERİ.....	56
4.5.BAZI ŞİFALI BİTKİLERİN TOPLAM PROOKSİDAN AKTİVİTELERİ.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Oksidatif stres.	4
Şekil 2.2: Askorbik asitin yapısı.	6
Şekil 2.3: Askorbik asitin prooksidan aktivitesi (Rietjens ve diğ., 2002).	7
Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel yapısı (Heim ve diğ., 2002).	8
Şekil 2.5: Flavonların yapısı.	8
Şekil 2.6: Flavonollerin yapısı.	9
Şekil 2.7: Flavanonların yapısı.	9
Şekil 2.8: Flavanollerin yapısı.	10
Şekil 2.9: İzoflavonların yapısı.	10
Şekil 2.10: Antosiyanidinlerin yapısı.	11
Şekil 2.11: Hidroksibenzoik asitlerin yapıları.	12
Şekil 2.12: Hidroksisinnamik asitlerin yapıları.	12
Şekil 2.13: Fenolik polimerlerin yapısı.	13
Şekil 2.14: Tanenlerin yapısı.	13
Şekil 2.15: Flavonoidlerin etkili radikal süpürme aktivitesi için gerekli olan ana yapısal özellikler.	15
Şekil 2.16: Karbon merkezli radikal oluşumu.	23
Şekil 2.17: Diamid (a), α -amidasyon (b) yollarıyla protein parçalanması.	23
Şekil 2.18: Proteinlerin ROS kaynaklı oksidasyonu.	24
Şekil 2.19: Eğri altında kalan net alan (AUC) tekniğiyle ORAC aktivitesinin hesaplanması.	28
Şekil 3.1: Protein yapısında prooksidan sensörü hazırlanışı.	38
Şekil 3.2: Protein-esaslı sensör kullanılarak Cu(II)-Nc yöntemi ile toplam prooksidan aktivite tayini.	39

Şekil 3.3: Protein-esaslı sensör kullanılarak Fe(III)-Fz yöntemi ile toplam prooksidan aktivite tayini.	40
Şekil 4.1: Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yönteminin inkübasyon süreleri optimizasyonu.	44
Şekil 4.2: Biyosensör esaslı Fe(III)-Ferozin yönteminin inkübasyon süreleri optimizasyonu.....	46
Şekil 4.3: ECAT için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.	50
Şekil 4.4: CAT için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.	50
Şekil 4.5: GA için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.	51
Şekil 4.6: CLA için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.	51
Şekil 4.7: QUE için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.....	52
Şekil 4.8: MYR için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.....	52
Şekil 4.9: AA için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.....	53
Şekil 4.10: Farklı oranlarda seyreltilen bitki ekstraktlarının, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc (A) ve Fe(III)-Fz (B) yöntemleri ile modifiye karbonil tayini (C) yöntemine göre hesaplanmış TPA (mM ECAT) değerleri.	59

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.	5
Tablo 4.1: Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yönteminin, ECAT standardı kullanılarak belirlenmiş analitik parametreleri.	48
Tablo 4.2: Çalışılan antioksidan bileşiklerin biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, biyosensör esaslı Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemlerine göre elde edilen doğru denklemi, korelasyon katsayısı (r) ve doğrusal aralık (μM) değerleri.	49
Tablo 4.3: ECAT standardı ile 5 kat seyreltik adaçayı ekstraktının, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile belirlenmiş TPA (mg ECAT L^{-1}) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (% 95 güvenilirlik aralığında).....	55
Tablo 4.4: ECAT standardı ile 5 kat seyreltik adaçayı ekstraktının, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile belirlenmiş TPA (mg ECAT L^{-1}) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (% 95 güvenilirlik aralığında).....	56
Tablo 4.5: Çalışılan bileşiklerin ikili sentetik karışımlarının deneysel olarak bulunan ve teorik olarak beklenen mM ECAT eşdeğeri cinsinden TPA değerleri.....	57
Tablo 4.6: Farklı seyreltiklikteki bitki ekstraktlarına ECAT katkısı yapılması sonucunda, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi ile belirlenmiş % geri kazanım (mM ECAT eşdeğeri) değerleri.....	61
Tablo 4.7: Farklı seyreltiklikteki bitki ekstraktlarına ECAT katkısı yapılması sonucunda, biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemine ile belirlenmiş % geri kazanım (mM ECAT eşdeğeri) değerleri.....	62

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Epa	: Anodic peak potential, Anodik pik potansiyeli
HO₂·	: Hidroperoksil radikali
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipokloröz asit
L·	: Alkil radikali
LOO·	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
M⁻¹s⁻¹	: İkinci derece tepkime hızı birimi (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
NO	: Nitrik oksit
ONOO⁻	: Peroksinitrit anyonu
O₂·⁻	: Süperoksit anyon radikali
¹O₂	: Singlet oksijen
·OH	: Hidroksil radikali
PhOH	: Fenolik antioksidan
pI	: İzoelektrik nokta
rpm	: Revolutions per minute, Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
AA	: Askorbik asit
ADP	: Adenosin 5'-difosfat
BCS	: Bathocuproindisulphonic acid, Batokuproindisülfonik asit
bdmC	: Bisdemetoksikurkumin
BHA	: Butillenmiş hidroksianisol
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
BPS	: Bathophenanthroline disulfonic acid, Batofenantrolin disülfonik asit
CAT	: Kateşin
CLA	: Klorojenik asit
Cu(II)-Nc	: Bakır(II)-Neokuproin
CUPRAC	: Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite

dmC	: Demetoksikurkumin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNP	: Dinitrofenilhidrazon
DNPB	: 2,4-Dinitrofenilhidrazin
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EB	: Etiliyum bromür
ECAT	: Epikateşin
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EPR	: Elektron paramanyetik rezonans
ESI-MS	: Electrospray ionization- mass spectrometry, Elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi
EtOH	: Etanol
Fe(III)-Fz	: Demir(III)-Ferrozin
Fz	: Ferrozin, 5,6-difenil-3-(2-piridil)-1,2,4-triazin-4',4''-disülfonik asit mono sodium tuzu
GA	: Gallik asit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HAT	: Hydrogen atom transfer, Hidrojen atomu transferi
LDL	: Low density lipoprotein, Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
MeOH	: Metanol
MeSOX	: Metiyonin sülfoksit
MYR	: Mirisetin
Nc	: Neokuproin, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin
NDGA	: Nordihidroguareyetik asit
ORAC	: Oxygen radical absorbance capacity, Oksijen radikal absorban kapasitesi
PA	: Perklorik asit
β-PE	: Phycoerythrin, Fikoeritrin
PG	: Propil gallat
QUE	: Kuersetin
ROS	: Reactive oxygen species, Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reactive nitrogen species, Reaktif azot türleri

RSS	: Reactive sulphide species, Reaktif kükürt türleri
SET	: Single electron transfer, Tek elektron transferi
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAK	: Toplam antioksidan kapasite
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Thiobarbituric acid reactive substance, Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TBHQ	: Tersiyer butilhidrokinon
TCA	: Trikloroasetik asit
TPA	: Toplam prooksidan aktivite



ÖZET

DOKTORA TEZİ

FENOLİK BİLEŞİKLERİN PROOKSİDAN AKTİVİTELERİNİ ALGILAMAK İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Esin AKYÜZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN

II. Danışman : Prof. Dr. Esmâ TÜTEM

Canlı organizmalarda normal hücrel metabolizma sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller oluşabilmektedir. Fizyolojik koşullarda meydana gelen reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin (RNS) inaktivasyonu için insan vücudu, antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Antioksidanlar ve prooksidanların dengelenememesi durumunda ortaya çıkan oksidatif gerilim; organizmada biyolojik makromoleküllerde hasara yol açarak çeşitli hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır. Fenolik bileşikler ile C vitamini, meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlardandır. Antioksidan sınıfı bileşiklerin sağlığa yararlı etkileri antioksidan özelliklerinden kaynaklanmasına karşın bazı koşullar altında prooksidan davranış gösterebildikleri de literatürde yer almaktadır. Mevcut yöntemler dolaylı ve zahmetli olduğundan, sağlıklı yaşam açısından faydalı bileşikler olduğu bilinen fenolik bileşiklerin prooksidan aktivitelerini tayin edebilecek kolay uygulanabilen, düşük maliyetli, kullanışlı, hızlı, duyarlı, tekrarlanabilirliği yüksek yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez kapsamında, bitkilerde bol miktarda bulunan fenolik bileşiklerin geçiş metal iyonu {Cu(II) ve Fe(III)}-katalizli prooksidan aktivitelerini ölçmek üzere protein esaslı bir biyosensör hazırlandı ve Cu(II)-Neokuproin ile Fe(III)-Ferrozin ayraçlarının kullanıldığı iki spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Biyosensörün hazırlanmasında, yumurta akı proteinleri kalsiyum klorür ile çöktürüldü ve çözünmeyen bir kalsiyum proteinat kompleksi elde edildi. Bu biyosensör, gallik asit (GA), kateşin (CAT), epikateşin (ECAT), kuersetin (QUE), klorojenik asit (CLA), mirisetin (MYR) ve askorbik asit (AA) gibi antioksidanların Cu(II)- ve

Fe(III)-katalizli prooksidan aktivitelerinin tayin edilmesi için kullanıldı. Önerilen yöntemler, antioksidan bileşiklerin Cu(II) iyonlarını Cu(I)'e, Fe(III) iyonlarını Fe(II)'ye indirgemesi (eş zamanlı reaktif oksijen türlerinin açığa çıktığı bilinmektedir) ve oluşan Cu(I) veya Fe(II)'nin katı biyosensöre bağlanması esasına dayanmaktadır. Antioksidanların prooksidan aktivitesinin bir göstergesi olan proteine bağlı-Cu(I), 450 nm'de neokuproin (Nc), proteine bağlı-Fe(II) ise 562 nm'de ferrozin (Fz) ayıraçları ile kolorimetrik olarak tayin edildi. Geliştirilen biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile referans yöntem olarak uygulanan modifiye karbonil tayini yöntemlerinin standart polifenolik bileşiklere uygulanması sonucu molar absorplama katsayıları belirlendi. Bileşiklerin, her bir yöntem ile belirlenmiş molar absorplama katsayıları bakımından aktivite sıralaması; QUE > ECAT > CAT > GA > CLA > MYR > AA; CLA > GA > ECAT > CAT ve QUE > CLA > CAT > GA > ECAT > AA > MYR şeklindedir. Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin prezisyonlarının istatistiksel karşılaştırılması amacıyla uygulanan *F*-testi değerlerine göre %95 güvenilirlik aralığında önemli bir farklılığın olmadığı görüldü. İkili sentetik karışım çözeltileri hazırlanarak bu karışımların ölçülen ve beklenen toplam prooksidan aktivite (TPA) değerleri mM ECAT eşdeğeri cinsinden hesaplanıp birbirleriyle karşılaştırıldı. Bu değerler incelendiğinde biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemiyle elde edilen deneysel ve teorik veriler birbiriyle daha uyumlu bulundu. Adaçayı (*Salvia officinalis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), mercanköşk (*Origanum majorana*) ve nane (*Mentha*) bitkilerinden hazırlanan ekstraktların, üç yöntemle de mM ECAT eşdeğeri cinsinden TPA değerleri belirlendi. Fe(III)-Fz yöntemi ile QUE, MYR ve AA bileşiklerinin prooksidan aktivitesi ölçülemediğinden antioksidan bileşikler içeren doğal örneklerin prooksidan aktivite ölçümü için Cu(II)-Nc yönteminin daha uygun olduğu sonucuna varıldı. Yumurta akı kullanılarak hazırlanan biyosensörün ucuz ve dayanıklı olması, tekrarlanabilir sonuçlar vermesi yöntemin uygulanmasında önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Ekim 2017, 94 sayfa.

Anahtar kelimeler: Protein esaslı biyosensör, prooksidan aktivite, bakır(II)-neokuproin yöntemi, demir(III)-ferrozin yöntemi, karbonil tayini

SUMMARY

Ph.D. THESIS

METHOD DEVELOPMENT FOR SENSING PROOXIDANT ACTIVITIES OF PHENOLIC COMPOUNDS

Esin AKYÜZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN

Co-Supervisor : Prof. Dr. Esmâ TÜTEM

In living organisms, reactive oxygen species (ROS) and free radicals can form during normal cellular metabolism. The human body has antioxidant defense mechanisms for the inactivation of reactive oxygen and reactive nitrogen species (RNS) that occur in physiological conditions. Oxidative stress occurs when antioxidants and prooxidants are not balanced; it causes damage to biological macromolecules in the organism, leading to the formation of various diseases. Phenolic compounds and vitamin C are natural antioxidants found in fruits and vegetables. Although the main health beneficial effects of antioxidant compounds are due to their antioxidant properties, they may exhibit prooxidant behavior under certain conditions. Since existing methods in the literature are indirect and troublesome, there is a need to develop easily applicable, low cost, useful, fast, sensitive, and reproducible methods that can determine the prooxidant activities of phenolic compounds known to be useful compounds for healthy life.

Within the scope of the thesis, a protein-based biosensor was prepared and Cu(II)-Neocuproin and Fe(III)-Ferrozine based, two spectrophotometric methods were developed to measure the transition metal ion{Cu(II) and Fe(III)}-induced prooxidant activities of phenolic compounds that exist in abundant amounts in plants. In preparing the biosensor, egg white proteins were precipitated with calcium chloride to obtain an insoluble calcium proteinate complex. This biosensor was used for the determination of Cu(II)- and Fe(III)-induced prooxidant activity of

antioxidants such as gallic acid (GA), catechin (CAT), epicatechin (ECAT), quercetin (QUE), chlorogenic acid (CLA), myricetin (MYR), and ascorbic acid (AA). These assays involved the reduction of Cu(II) ions to Cu(I) and Fe(III) ions to Fe(II) by antioxidant compounds (simultaneously giving rise to reactive oxygen species) and binding of the formed Cu(I) or Fe(II) to the solid biosensor. As an indicator of prooxidant activity of antioxidants on proteins, the protein-bound Cu(I) and Fe(II) were colorimetrically determined at 450 nm with neocuproine (Nc) and at 562 nm with ferrozine reagents, respectively. The molar absorption coefficients of the standard polyphenolic compounds were determined with respect to the developed biosensor based Cu(II)-Nc and Fe(III)-Fz methods and the modified carbonyl detection assay as reference method. The order of the molar absorption coefficients of the compounds in terms of determined amount by each method were; QUE > ECAT > CAT > GA > CLA > MYR > AA; CLA > GA > ECAT > CAT and QUE > CLA > CAT > GA > ECAT > AA > MYR. For statistical comparison, the *F*-test values were compared and there was no significant difference in the 95% confidence interval between the precisions of the biosensor based Cu(II)-Nc and modified carbonyl detection methods and the biosensor based Cu(II)-Nc and Fe(III)-Fz methods. Binary synthetic mixture solutions were prepared and the found and expected total prooxidant activity (TPA) values of these mixtures were calculated as mM ECAT equivalent and compared with each other. When these values were examined, the experimental and theoretical data obtained by the biosensor based Cu(II)-Nc method were more compatible with each other. The TPA values of the extracts prepared from sage (*Salvia officinalis*), green tea (*Camellia sinensis*), marjoram (*Origanum majorana*) and mint (*Mentha*) were determined by the three methods in terms of mM ECAT equivalent. Since the prooxidant activity of the QUE, MYR and AA compounds could not be measured by the Fe(III)-Fz method, it was concluded that the Cu(II)-Nc method was more suitable for measuring the prooxidant activity of natural samples containing antioxidant compounds. The fact that the biosensor prepared using egg white was cheap and durable, yielding reproducible results gives a significant advantage to the application of the method.

October 2017, 94 pages.

Keywords: Protein based biosensor, prooxidant activity, cupric-neocuproine assay, ferric-ferrozine assay, carbonyl detection

1. GİRİŞ

Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikaller olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Biyolojik sistemlerde, ROS haricinde, reaktif azot ve kükürt türleri (RNS ve RSS) de oluşabilir. Bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir (Halliwell, 2008). Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif gerilim olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Oksidatif gerilim, organizmadaki prooksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır ve biyolojik makromoleküllerde hasara yol açmaktadır (Chedea ve diğ., 2010). Oluşan bu hasar, kanser, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir. Modern tıp bir yandan hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler araştırırken bir yandan da sağlıklı bir yaşam sürdürme ve hastalıkları önleme alanında yoğun çalışmalar yapmaktadır. Bu bağlamda, serbest radikal oluşumunun ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi söz konusu hastalıklara yakalanma riskini azaltmak üzere antioksidan diyet uygulanması ve/veya ilaç kullanımı açısından önemli olmaktadır.

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıllarda, baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunurlar. Bu kaynaklarda bulunan antioksidanlar; tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler gibi fenolik bileşikler, alkaloid, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir. Fenolik bileşikler ile C vitamini meyve ve sebzelerde bol bulunan doğal antioksidanlardır. Antioksidan özelliğe sahip bileşikler sağlığa yararlı etkiler göstermelerine karşın bazı koşullar (geçiş metali iyonları ve bunların derişimi, O₂ vb.) altında prooksidan davranış gösterebilmektedirler (Rietjens ve diğ., 2002). Yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin geçiş metal iyonu varlığında prooksidan etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Childs ve diğ., 2001; Hanif ve diğ., 2008). Fenolik bileşiklerin metal katalizli yükseltgenmesinin sonucunda, reaktif oksijen türleri yanında yüksek elektrofilik türler olan semikinon radikalleri de meydana gelebilmektedir. (Hagerman ve diğ., 2003). Biyoaktif maddelerin yapılarına ve buldukları koşullara göre antioksidan/prooksidan

davranışlarının anlaşılması son derece önemlidir. Birçok bitki polifenollerini ortam koşullarına bağlı olarak antioksidan ya da prooksidan aktivite gösterebilir.

Literatürde, fenolik bileşiklerin protein hasarına bağlı prooksidan aktivitesinin ölçümü için TBARS, karbonil tayini, ORAC, EB, BCS ve pirogallol yöntemleri gibi az sayıda yöntem bulunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1981; Levine ve diğ., 1994; Yi ve diğ., 2009; Magnani ve diğ., 2000; Cao ve diğ., 1997; Zheng ve diğ., 2008). Mevcut yöntemler dolaylı ve zahmetli olduğundan, sağlıklı yaşam açısından faydalı bileşikler olduğu bilinen fenolik bileşiklerin prooksidan aktivitelerini tayin edebilecek kolay uygulanabilen, düşük maliyetli, kullanışlı, hızlı, duyarlı, tekrarlanabilirliği yüksek yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Daha önce yapılan bir çalışmamızda (Kondakçı ve diğ., 2013), içerdiği proteinlerde tiyol (-SH) grubu bulunan yumurta akı çözeltisi kullanılarak, çeşitli polifenolik bileşiklerin, C ve E vitaminlerinin ve bazı şifalı bitki ekstraktlarının Cu(II) katalizli prooksidan aktivitelerini ölçmek amacıyla spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, proteine bağlanan Cu(I)'in neokuproin (Nc) ayırıcı ile oluşturduğu kelatin 450 nm'deki absorpsiyonunun ölçümüne dayanmaktaydı. Bu tez çalışmasının amacı ise özellikle bitkisel örneklerde bol miktarda bulunan ve bugüne kadar antioksidan özelliğiyle öne çıkan fenolik bileşiklerin metal katalizli {Cu(II) ve Fe(III)} prooksidan aktivitelerinin ölçümü için protein yapısında katı bir prooksidan sensörü hazırlamak ve basit kolorimetrik yöntemler geliştirmektir. Bu nedenle, bir önceki çalışmada kullanılan yumurta akı çözeltisi yerine yumurta akından hazırlanmış olan, dayanıklı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren protein yapısında katı bir biyosensör kullanıldı. Denenen çeşitli protein çöktürme yöntemleri arasında CaCl₂ ile çöktürmenin uygun olduğu görüldü. Elde edilen katı biyosensör Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz ayırıcıları ile polifenoller ve bitki örneklerinin Cu(II)- ve Fe(III)-katalizli prooksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldı. Prooksidan aktivitesi incelenen bileşikler; GA (hidroksibenzoik asit), CLA (hidroksisinnamik asit), CAT, ECAT (flavanol), QUE, MYR (flavonol), AA (fenolik olmayan antioksidan) gibi farklı antioksidan ve polifenol sınıflarını temsil edecek şekilde seçildi.

Bakır iyonlarının proteinlerin tiyol gruplarına geri dönüşümsüz ve spesifik olmayan bir şekilde bağlanabileceği daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Letelier ve diğerlerinin (2010) bulgularına göre oksidatif hasar ve biyomoleküllere spesifik olmayan bağlanma açısından bakır(II), demir(III)'den daha toksik etki gösterebilmektedir. Bu çalışmamızda, yumurta akından hazırlanan protein yapısındaki biyosensörü kullanarak, bazı fenolik bileşikler ve C

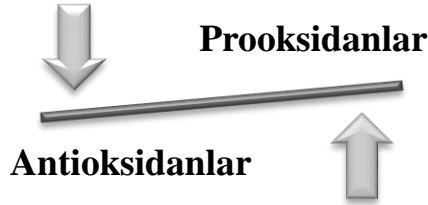
vitamininin Cu(II) ve Fe(III) katalizli prooksidan aktivitelerini ölçmek amacıyla kolorimetrik yöntemler {Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz} geliştirdik.

Proteinler, oksidatif hasarın başlıca hedefleri olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stresin proteinlerde neden olduğu oksidasyon sonrası peroksitler ve protein karbonilleri meydana gelir. Oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak, kararlı olması ve erken oluşması gibi nedenlerle, protein karbonil grupları kullanılmaktadır (Dalle-Donne ve diğ., 2003). Protein oksidasyonunun ürünü olan karbonil grupları Alzheimer hastalığı, diyabet, inflamatuvar kemik hastalığı, artrit gibi bazı hastalıklarda bir belirteç olarak görülmektedir (Chevion ve diğ., 2000). Bu nedenle hazırlanmış olduğumuz protein yapısındaki biyosensörde, prooksidan etki sonucu açığa çıkabilecek karbonil gruplarını belirlemek amacıyla modifiye karbonil tayini yöntemini kullandık. Her üç yöntem standart maddelerin, sentetik karışımların ve bitki (adaçayı, yeşil çay, mercanköşk ve nane) ekstraktlarının toplam prooksidan aktivitelerini (mM ECAT eşdeğeri) ölçmek için kullanıldı. Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri bulguları birbirleriyle ve modifiye karbonil tayini yöntemi bulgularıyla karşılaştırıldı. Protein yapısındaki kolay hazırlanabilen, dayanıklı katı biyosensör adı geçen ayıraçlarla, fenolik bileşiklerin ve bitki örneklerinin prooksidan aktivitelerinin belirlenmesinde ilk kez kullanıldı ve anlamlı sonuçlar elde edildi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Oksijen canlılar için yaşamsal önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Canlı organizmalarda normal hücresel metabolizma sırasında reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller oluşabilmektedir (Hawkins ve diğ., 2009). Serbest radikaller; oldukça kararsız ve diğer moleküllerle kimyasal tepkimelere girme eğilimi yüksek, çiftleşmemiş elektron bulunduran atom, molekül ya da iyonlar olarak ifade edilirler. Sırasıyla, reaktif oksijen (ROS), reaktif azot (RNS) ve reaktif kükürt (RSS) türlerini oluşturan oksijen, azot ve kükürt olmak üzere 3 elementten türemişlerdir. Reaktif türler; süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot}), hidroksil radikali ($\cdot OH$), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2), hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) gibi serbest radikalleri ve diğer türleri kapsamaktadır. Reaktif kükürt türleri ise ROS ile tiyol gruplarının tepkimesinden kolayca oluşmaktadır (Carocho ve Ferreira, 2013).



Şekil 2.1: Oksidatif stres.

Organizmadaki antioksidan ve prooksidan dengesi prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres koşulları altında, çeşitli hastalıkların oluşumunu tetikleyen ROS türleri meydana gelebilmektedir (Lü ve diğ., 2010). Serbest radikaller oldukça kararsız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup elektronları, nükleik asit bazları, proteinlerde amino asit yan zincirleri, doymamış yağ asitlerinin çifte bağları ile etkileşime girerek oksidatif hasar meydana getirirler.

2.2.ANTİOKSİDANLAR

Canlı hücreler normal fizyolojik koşullarda, serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan iki kategoride incelenebilir (Tablo 2.1) (Rice-Evans ve diğ., 1997).

Tablo 2.1: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.

ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR	
	Doğal Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	C Vitamini	Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
Glutasyon peroksidaz (GPx)	E Vitamini	Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Karotenoidler	Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)
Katalaz	Polifenolik bileşikler	Nordihidroguareyetik asit (NDGA)
Glutasyon redüktaz (GR)		Alkil gallat türevleri

Enzimatik antioksidanlar SOD, GPx ve katalaz enzimlerini kapsamaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (C vitamini), α - tokoferol (E vitamini), GSH, karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanları içermektedir. İntraselüler antioksidan enzimler, reaktif oksijen türlerini inaktive etmek için ilk savunma sistemi olarak etki göstermektedirler. İlk tepkime, süperoksit radikallerinin süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonu şeklindedir. Bunu takiben hidrojen peroksit, katalaz ve glutasyon peroksidaz katalizörlüğünde ortamdan uzaklaştırılmaktadır.

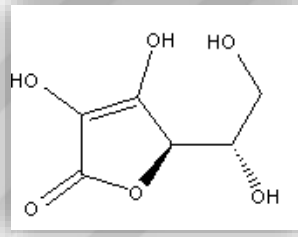
Vücuttaki savunma sistemlerine destek olarak gıda yoluyla antioksidan alınması pek çok hastalığın önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve polifenoller meyve ve sebzelerde yararlı bileşenler olarak bulunan, doğal antioksidanlardır. Bu bileşiklerin sağlığa yararlı etkileri büyük ölçüde antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ancak bazı koşullar altında prooksidan aktiviteleri sebebiyle toksik etki de gösterebilmektedirler (Rietjens ve diğ., 2002).

Gıdaların tat, renk ve vitamin değerlerinin korunması için de çoğu zaman antioksidan ilavesi gereklidir. Endüstride, sentetik antioksidanlardan en çok kullanılanları BHA, BHT, TBHQ ve

propil gallat (PG)'dir. Oksidasyonu geciktirmek veya engellemek amacıyla gıdalara katkı maddesi olarak ilave edilirler. Zararlı etkileri ile ilgili son yıllardaki çalışmalar sonucu BHA ve BHT'nin kullanımları yasaklanmış olup, bu amaçla da doğal antioksidanlardan yararlanma çalışmaları önem kazanmıştır (Anbudhasan ve diğ., 2014; Moure ve diğ., 2001).

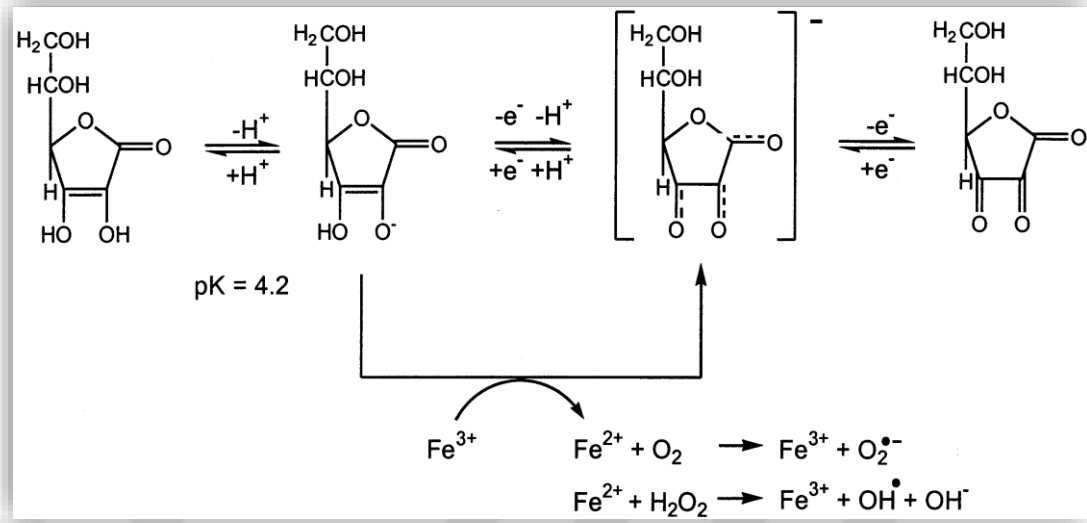
2.2.1.C Vitamini

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini (Şekil 2.2), diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilir ve serbest radikalleri doğrudan süpürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Ayrıca çeşitli besin maddelerinde acılaşıma ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini önler. Doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler (Hudson, 1990).



Şekil 2.2: Askorbik asitin yapısı.

Yaygın olarak askorbik asitin tüketim miktarının artmasıyla yararlı etkisinin de arttığına inanılır. Normal koşullarda antioksidan özelliğinden ötürü oksidatif strese karşı direnç sağlar. Ancak askorbik asitin antioksidan özellikleri iyi bilinmesine rağmen çevreye ve aktif molekül içeren koşullara bağlı olarak prooksidan aktivite gösterebilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Askorbik asitin prooksidan aktivitesi (Rietjens ve diğ., 2002).

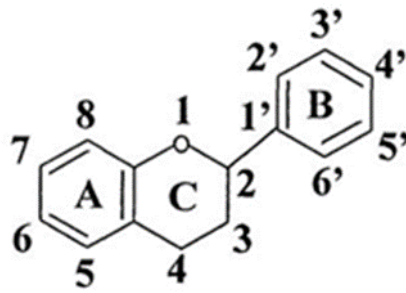
2.2.2. Polifenolik Bileşikler

Polifenoller bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. En çok fenilpropanoid yolu ile sentez edilen fenolik bileşikler, halkalı yapıdaki fonksiyonel hidroksil gruplarının farklı pozisyonlarda bulunmasına göre karakterize edilirler.

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenollerini multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve ROS türleri süpürücü olarak, bazıları metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar (Makris ve Rossiter, 2002).

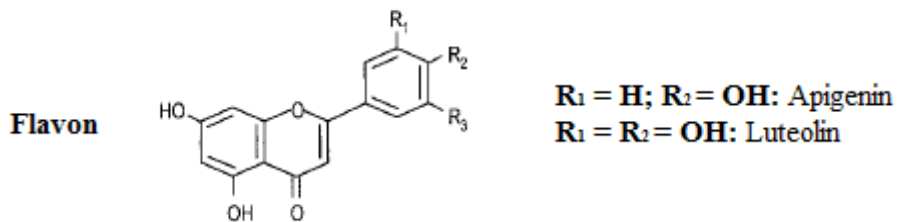
Yiyeceklerde genellikle 3-orto glikozitleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal süpürme ve kelatlama aktivitesine sahiptirler (Ohshima ve diğ., 1998). Bitki polifenollerini doğal antioksidanlar olarak bilinmelerine rağmen tek başlarına ya da bakır gibi geçiş metal iyonu varlığında, oksidatif biyomoleküllerin bozunmalarını katalizlerler. Bu bağlamda birçoğu hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteye sahiptirler (Hanif ve diğ., 2008).

Flavonoidler, (C₆C₃C₆) karbon iskeletine sahip düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir. Bu üç halkadan A ve B yi 6 karbonlu iki aromatik halka C yi ise 3 karbonlu piran halkası oluşturur. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır. Bu sınıflardan biri antoksaninler diğeri antosiyaninlerdir. Antoksaninler kendi arasında flavonlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar ve flavanonlar olmak üzere 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır.



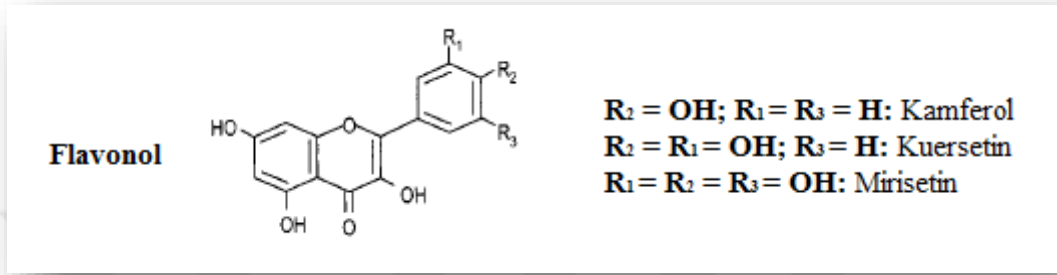
Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel yapısı (Heim ve diğ., 2002).

Flavonoidler sınıfının temel maddesi 2-fenil kromon olan *flavon*'dur (Şekil 2.5). En önemli flavonlar; apigenin ve luteolin'dir. Apigenin; maydonoz ve kereviz sapında, luteolin ise acı biberde bulunmaktadır.



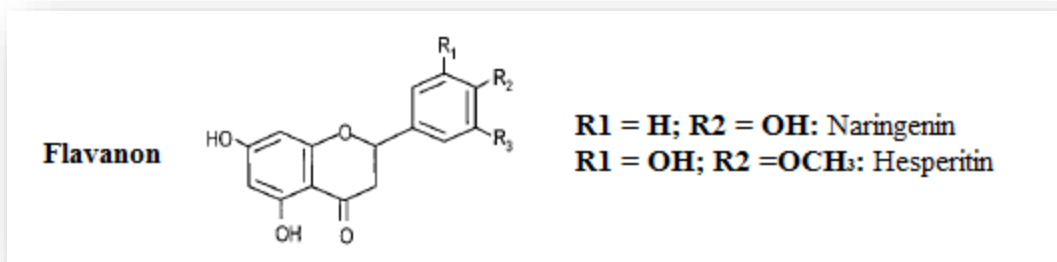
Şekil 2.5: Flavonların yapısı.

Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, rutin, mirisetin, fisetin ve kaempferol'dur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğanda, elmada ve lahanada bol miktarda bulunur. Rutin kuersetinin glikozidi olup kırmızı şarap ve domateste mevcuttur.



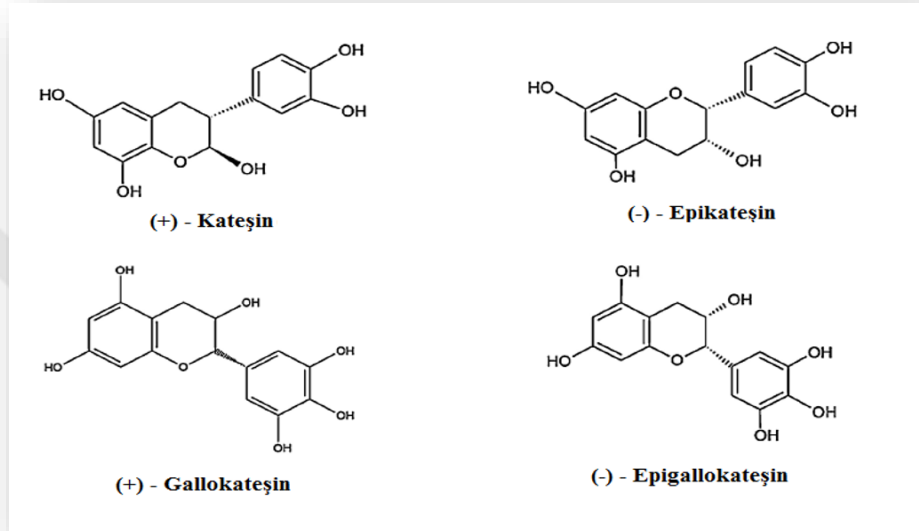
Şekil 2.6: Flavonollerin yapısı.

Flavonun dihidroksi türevi *flavanon*'dur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringenin 3-hidroksi flavanon'dur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikozidi olan naringin'dir. Turunçgillerden ekşi portakalda bulunur ve son derece acıdır. Naringenin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda bolca bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozitidir.



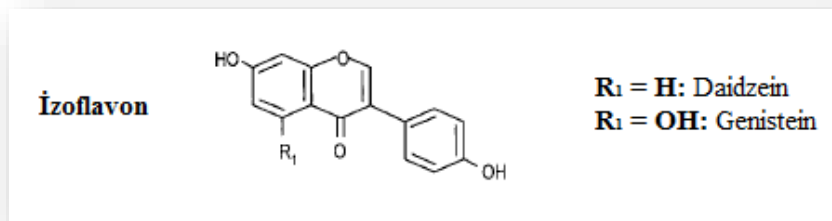
Şekil 2.7: Flavanonların yapısı.

Flavonollerin C halkasında bulunan keto grubunun yerine $-CH_2$ grubu geldiğinde *flavanol* oluşur. Flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada bol miktarda bulunurlar.



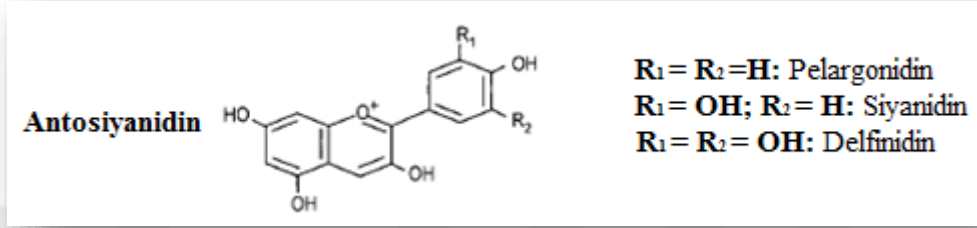
Şekil 2.8: Flavanollerin yapısı.

Flavonların izomeri olan *izoflavonlar* ise aromatik B halkasının, C halkasının 3. karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur. Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan genistin ve daidzin başlıca izoflavonlar olup soya fasulyesi ile soya fıstığında mevcuttur.



Şekil 2.9: İzoflavonların yapısı.

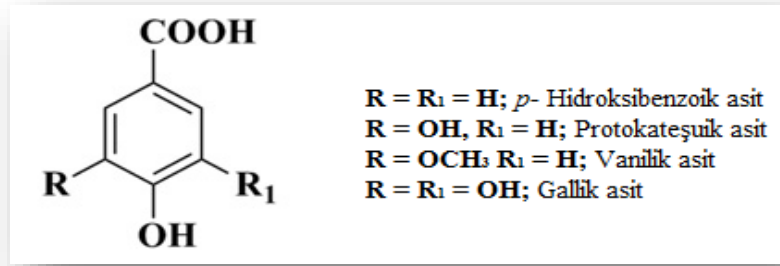
Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikoziti olup B halkasındaki grupların konumuna göre karakterize edilirler. Yapısındaki elektron eksikliği onları oldukça reaktif yapar ve kararlılıkları pH ve sıcaklığa bağlıdır. Bitkilerde suda çözünebilir pigmentlerin en geniş sınıfını oluştururlar. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delfinidin'dir. Renkli meyvelerde özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunur.



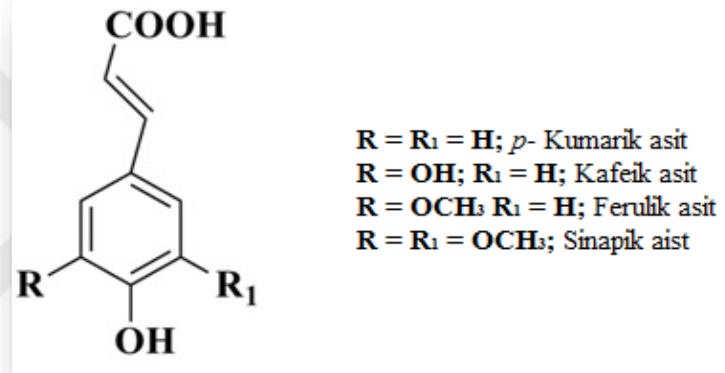
Şekil 2.10: Antosiyanidinlerin yapısı.

Bitkilerde çok miktarda bulunan **fenolik asitler**, diğer ismiyle fenil propanoidler, *hidroksibenzoik asitler* ve *hidroksisinnamik asitler* içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksisinnamik asitler oluşturur. *L*-fenil alanin veya *L*-tirosinden *p*-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asitler meydana gelir. Yapılarındaki -CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini arttırmakla birlikte benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Benzoatlardan daha etkilidirler.

Hidroksibenzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik ve protokateşuik asittir. Mono hidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Dihidroksibenzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, *o-p* pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, *m-p* pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer.

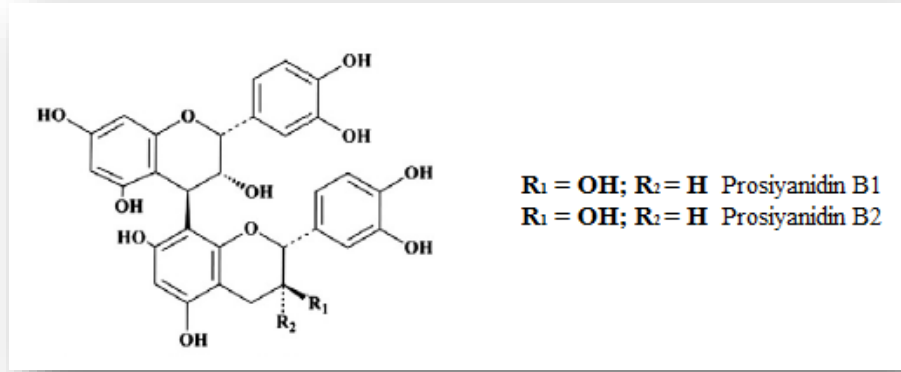


Şekil 2.11: Hidroksibenzoik asitlerin yapıları.

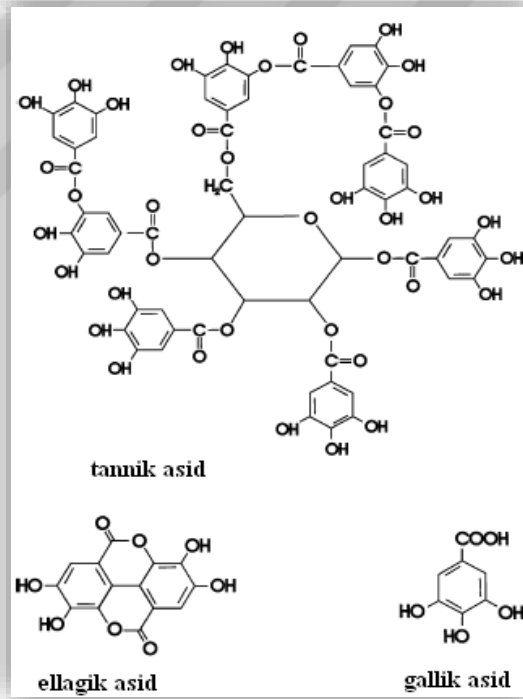


Şekil 2.12: Hidroksisinnamik asitlerin yapıları.

Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Kendi içinde kondanse tanenler ve hidrolizlenebilen tanenler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Protoantosiyeninler, polimerik flavonoidlerdir. En yaygın olarak çalışılan kondanse tanenler, kateşin ve epikateşin yapılarıdır. Hidrolizlenebilen tanenler ise gallik asit ve ellagik asit türevleridirler. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı şarap, beyaz şarap, elma ve nar suyunda mevcuttur.



Şekil 2.13: Fenolik polimerlerin yapısı.



Şekil 2.14: Tanenlerin yapısı.

2.3.ANTİ- VE PROOKSİDAN AKTİVİTE

Canlı organizmalar, serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler. Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğunda serbest radikallerin ve reaktif türlerin biyolojik makromoleküllere karşı olumsuz etkilerini önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir (Halliwell ve diğ., 1995).

Oksidatif hasara karşı iç enzimatik savunmalar tamamen etkili değildir ve bir seri iç ve dış serbest radikal yok edici antioksidanlar, ikinci savunma sistemi olarak hareket ederler. Antioksidanlar, okside olabilen bileşikten daha düşük derişimde, o bileşimin oksidasyonunu önleyen ya da geciktiren bileşikler olarak bilinirler. Sonraki zamanlarda bu tanım, “Bir hedef moleküle karşı oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran maddelerdir”, şeklinde değışmiştir. Aynı süreçte, “Reaktif türleri doğrudan süpürebilen veya dolaylı olarak antioksidan savunma sistemini güçlendiren ya da ROS üretimini engelleyen maddelerdir”, tanımı da kullanılmaya başlanmıştır (Carocho ve Ferreira, 2013).

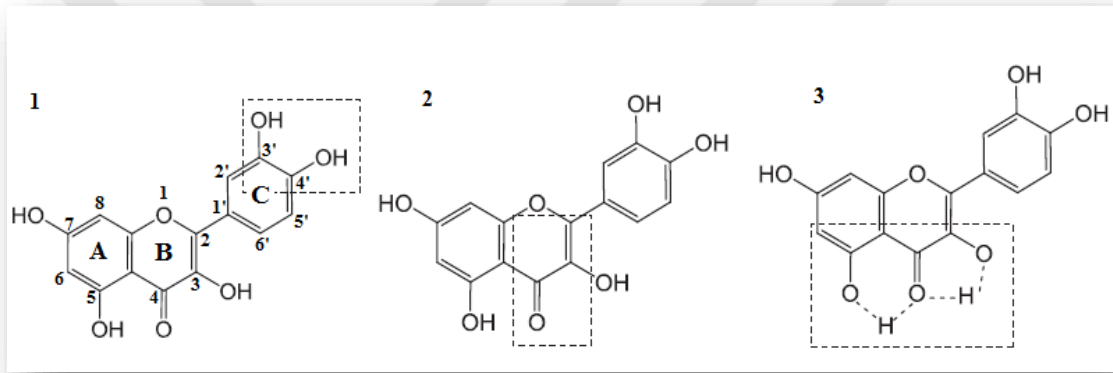
Fenolik antioksidanların, serbest radikallerin yol açtığı hasarı önleyebilme mekanizmaları, aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir.

- Reaktif türlerin doğrudan süpürülmesi,
- Antioksidan enzimlerin aktivasyonu,
- Metal kelatlama aktivitesi,
- α - tokoferil radikallerinin indirgenmesi,
- Oksidazların inhibisyonu,
- Nitrik oksit kaynaklı oksidatif stresin hafifletilmesi,
- Ürik asit seviyesinin artışı,
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların antioksidan özelliklerinin artışı

Biyolojik sistemlerdeki antioksidan aktiviteye sahip bileşikler yaşam için önemli, temel bir ihtiyaçtır. Antioksidanlar, kompleks bir yapıya sahiptirler. Direkt ve indirekt antioksidanlar olarak tanımlanırlar. Direkt antioksidanlar (glutatyon, fenolik bileşikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidler gibi) fizyolojik, biyokimyasal veya hücrel proseslerde yer alarak serbest radikalleri inaktive ederler veya serbest radikaller tarafından başlatılan kimyasal tepkimeleri önlerler (Papetti ve diğ., 2006). Direkt antioksidanların aynı zamanda prooksidan etkilerinin

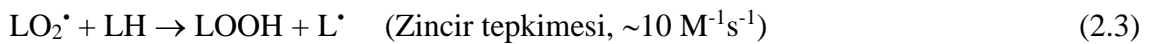
olduğu da deneysel olarak saptanmıştır. Ancak bu tepkimelerin *in vivo* açıdan değerlendirilmesi oldukça önem arz etmektedir. İndirekt antioksidanlar ise serbest radikal veya redoks tepkimelerinin engellenmesinde rol oynamazlar. Bunlar hücrenin antioksidan kapasitesini güçlendirirler. Bunun nedeni insan vücudunda bulunan bir grup enzimin (glutatyon transferaz, kinon redüktaz, epoksit hidrolaz) elektrofilik türlerin detoksifikasyonuna yol açmasıdır.

Flavonoidlerin etkili radikal süpürme aktivitesi için gerekli olan ana yapısal özellikler Şekil 2.15'teki gibi özetlenebilir (Procházková ve diğ., 2011). B halkasındaki *orto*-dihidroksi (kateşol) yapısı (1), C halkasındaki 2,3 çift bağ ile 4-okso fonksiyonel grubu arasındaki konjugasyon (2), 3 ve 5 pozisyonlarındaki hidroksil grupları (3) şeklindedir.



Şekil 2.15: Flavonoidlerin etkili radikal süpürme aktivitesi için gerekli olan ana yapısal özellikler.

Antioksidan bileşiklerin önleyici rol oynadığı oksidasyon prosesinde iki yol izlenmektedir. Bu yollar temel olarak hidrojen atomu transferi (hydrogen atom transfer, HAT) ya da tek elektron transferi (single electron transfer, SET) tepkimelerine dayanmaktadır. Birincisi, aşağıda verilen lipid peroksidasyonunda gerçekleşen H-atomu transferidir.



Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinde alkil radikalinin (L[•]) oluşumuyla başlayan bir radikal zincir tepkimesidir (Eşitlik 2.1). Alkil radikali (L[•]), lipid peroksil radikalini (LOO[•]) meydana getirmek üzere moleküler oksijenle (O₂) tepkimeye girer (Eşitlik 2.2). Zincir kırıcı antioksidanların olmadığı durumlarda oluşan bu peroksil radikalleri, yükseltgenmemiş lipid substratlardan (LH) hidrojen atomu transfer ederek yeni alkil radikallerinin (L[•]) oluşmasıyla sonuçlandığından zincir tepkimesini çoğaltırlar (Eşitlik 2.3). Eşitlik 2.3'te oluşan lipid hidroperoksitler (LOOH), geçiş metal iyonu katalizli veya Fenton tipi tepkimeyle kararsız alkoksil radikalleri ve sonunda ikincil oksidasyon ürünlerini (malondialdehit gibi) meydana getirirler. Eşitlik 2.3'teki lipid peroksil radikali ile yükseltgenmemiş lipid substrat arasındaki tepkime göreceli olarak yavaş (10 M⁻¹s⁻¹) olduğundan fenolik antioksidanlar (PhOH) peroksil radikalleri ile etkileşerek araya girerler ve bu zincir tepkimeyi durdururlar.



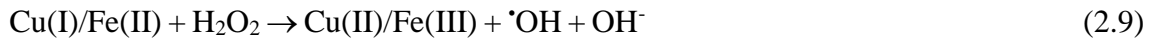
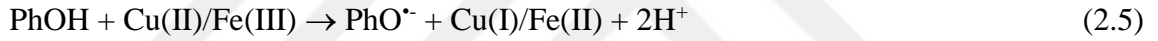
Eşitlik 2.4'ün hızı, fenolik bileşiklerin bağ enerjilerine bağlıdır. Hidroksil grubunun O-H bağı daha zayıf olduğundan peroksil radikalleri ile tepkime hızlı gerçekleşmektedir (Laguerre ve diğ., 2007).

Prooksidanlar biyolojik makromoleküllerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ya da hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Biyoaktif maddelerin yapılarına ve buldukları deneysel koşullara göre antioksidan/prooksidan davranışlarının anlaşılması son derece önemlidir (Laguerre ve diğ., 2007). Flavonoidler Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeyebilir ve aynı anda serbest radikal oluşumunu sağlayabilirler. Bir flavonoidin bakır-katalizli prooksidan aktivitesi, moleküler yapısındaki hidroksil grupların sayısına ve konumuna bağlıdır. Yapı-aktivite ilişkilerine göre flavonoller, aynı sayıda hidroksil grubuna sahip olan flavononlara kıyasla daha yüksek bakır-katalizli prooksidan aktivite gösterebilmektedir (Cao ve diğ., 1997).

Birçok bitki polifenolleri hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteye sahiptirler. Yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin geçiş metal iyonu varlığında prooksidan etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Childs ve diğ., 2001). Örneğin; kuersetin, mirisetin ve kamferol gibi flavonoidlerin geçiş metal iyonu varlığında, lipid peroksidasyonu veya DNA hasarına neden olabildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aynı şekilde askorbik asitin de geçiş metal iyonu varlığında antioksidan özelliğinden ziyade prooksidan özelliğinin öne çıktığı

bilinmektedir. Kateşin türü polifenollerin, prooksidan aktivitelerinden dolayı proteinlerde protein karbonili oluşumuna neden olduğu ifade edilmektedir (Ishii ve diğ., 2010).

Kateşol grubu, Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeyerek Fenton tepkimesini katalizler ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırarak prooksidan aktivite göstermiş olur. Kateşollerin Cu(II) ile başlangıç oksidasyonunda, oksijenle süperoksit anyon radikali üretmek (Eşitlik 2.6) üzere etkileşime giren, semikinon (Eşitlik 2.5) oluşmaktadır. Bu tepkime, süperoksit anyon radikali fenolik bileşiği yükseltgeyerek semikinon ve hidrojen peroksit ürettiğinden (Eşitlik 2.7), otokatalitik karakterlidir. Ayrıca H₂O₂, süperoksit anyon radikalının disproporsiyonlanmasıyla da (Eşitlik 2.8) meydana gelebilmektedir. Cu(I) varlığında H₂O₂ hızlı bir şekilde Fenton tipi tepkimeyle (Eşitlik 2.9) hidroksil radikaline dönüşmektedir. Meydana gelen hidroksil radikali ortamdaki biyolojik makromoleküllerin oksidatif hasarına yol açar. Benzer olaylar, Fe(III) ionlarıyla da mümkün olabilmektedir. (Sakihama ve diğ., 2002; Eghbaliferiz ve Iranshahi, 2016).



↓ makromoleküller (proteinler, nükleik asitler, lipidler)

Oksidatif hasar

Flavonoidlerin antioksidan/prooksidan dengesi, özellikle metal kelatlayıcılar ile hedef biyomoleküllerin (lipidler, proteinler, nükleik asitler vb.) varlığı ve çevreye bağlıdır. Polifenolik bileşikler Fe(III), Cu(II) gibi metalleri Fe(II), Cu(I) türlerine indirgeyerek serbest radikal oluşturur, protein ve DNA oksidatif hasarına neden olurlar (Hajji ve diğ., 2006).

2.4.METALLERİN PROOKSİDAN AKTİVİTEDEKİ ROLÜ

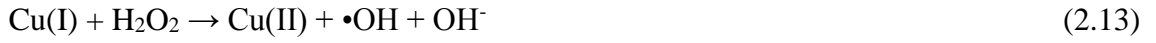
Yapılan çoğu araştırmada metal-katalizli toksisite ve kanserojenlik üzerine odaklanılmış olup biyolojik sistemlerde reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumundaki rolleri ve önemi vurgulanmıştır. Metal-katalizli serbest radikal oluşumunun, DNA bazlarında çeşitli değişiklikler, lipid peroksidasyonunda artış ve kalsiyum ile sülfhidril homeostazında değişikliğe neden olabildiği söylenmektedir (Valko ve diğ., 2006). Geçiş metalleri tarafından üretilen toksisiteler genellikle nörotoksisite, hepatotoksisite ve nefrotoksisiteyi içermektedir. Metal iyonlarının toksisiteleri; çözünürlük, taşınma, absorplanabilirlik, kimyasal reaktivite ve vücutta oluşan kompleksler arasındaki farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu faktörlere rağmen temel mekanizma aynıdır (Stohs ve Bagchi, 1995).

Demir, en çok incelenen iki geçiş metalinden biri olup, oksijen ve biyolojik makromoleküller arasındaki redoks tepkimelerini katalizleme yeteneğine sahiptir. Adenosin 5'-difosfat (ADP), histidin, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), sitrat ve diğer kelatlayıcı maddeler ile kompleks oluşturan demirin, ROS oluşumunu kolaylaştırdığı ve lipid peroksidasyon üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Demir kompleksinin Fenton tepkimesini katalizleyerek, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksitin, lipid peroksidasyonunu başlattığı bilinen, hidroksil radikale dönüşmesini kolaylaştırdığı yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır.



Karmaşık biyolojik sistemlerde, peroksidatif tepkimelerin başlatıcıları olarak demir-oksijen kompleksi ve hidroksil radikalleri arasında ayırım yapmak güçtür. Bilindiği gibi Fe organizmada, depolama proteini olan ferritin ile depolanır ve taşıma proteini olan transferrin ile kan dolaşımına katılır. Fenton tepkimesiyle reaktif türlerin üretimine katılabilmesi için serbest halde veya katalitik olarak aktif formda bulunmalıdır (Valko ve diğ., 2006).

Bakır, doğada yaygın olarak bulunan, oksidazlar ve oksijenazlar da dahil olmak üzere, birçok enzim için ortak bir kofaktör olan esansiyel bir elementtir. Demire benzer şekilde, bakır reaktif oksijen türlerinin oluşumunda bir katalizör görevi görerek membran lipidlerinin peroksidasyonunu katalizler.



Bakırın, derişime bağlı olarak, hidrokinonun benzokinona oksidasyonunu önemli ölçüde hızlandırdığı söylenmektedir. Bazı çalışmalarda, bakırın hidrokinon varlığında DNA zincir kırılmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Cu(II) iyonunun, hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek, DNA hasarından doğrudan sorumlu olabilen, yüksek seviyelerde hidroksil radikalleri ürettiği ifade edilmektedir (Valko ve diğ., 2006; Stohs ve Bagchi, 1995).

Oldukça toksik olan **kadmiyum** metali, endüstriyel uygulamaların sonucu olarak çevrede birikimi nedeniyle endişe yaratan, doğada bolca bulunan ve esansiyel olmayan bir elementtir. Boyalarda renk pigmenti olarak kullanılmasının yanı sıra çinko ve kurşun madenciliği ile eritme işlemlerinin yan ürünüdür. Çözünebilen kadmiyum tuzları birikimi karaciğer, böbrekler, beyin, akciğerler, kalp ve merkezi sinir sisteminde toksisiteye sebep olmaktadır. Kansorejen özelliğe sahip bu metal, mesleki maruziyet sonucunda akciğer, prostat, pankreas ve böbrek kanserleriyle ilişkilendirilmiştir. Kadmiyum tek başına doğrudan serbest radikal üretiminden sorumlu olmamasına karşın, sitoplazmik ve membran proteinlerindeki demir ya da bakırla kolaylıkla yer değiştirebildiğinden ortamda serbest demir ya da bakır oranını arttırmakta ve bunun sonucunda Fenton tepkimesi yoluyla oksidatif stres oluşmaktadır (Valko ve diğ., 2006; Stohs ve Bagchi, 1995).

Kromun (III) formu, kan glukoz düzeyinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamasına karşın, (VI) formu, yüksek dozlarda potansiyel olarak toksik ve kanserojendir. Tüm kromatlar (Cr(VI)), SO_4^{2-} ve HPO_4^{2-} gibi izoelektrik ve eş yapılı anyonların transferini sağlayan kanallar vasıtasıyla aktif olarak hücelere girebilirler. Çözünmeyen kromatlar ise fagositoz yoluyla hüceler tarafından emilirler (Valko ve diğ., 2006). Krom, çelik alaşımli dökme demir, boyalar, metal kaplamaları ve ahşap işleme alanlarında yaygın olarak kullanılan endüstriyel bir kimyasaldır. Kromun insanlarda ve hayvanlarda alerjik, toksik ve kanserojen etkilere neden olduğu bilinmektedir. Glutasyon, B2 vitamini, E vitamini ve C vitamini gibi reaktif tür süpürücülerinin krom kaynaklı DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, enzim inhibisyonu, sitotoksisite ve mutajenez gibi hasarlarda, *in vivo* ve *in vitro* etkileri incelenmiştir. Nötral sulu çözeltilerde Cr(VI)'nın hakim formu olan kromat iyonu $[\text{CrO}_4]^{2-}$, hücre zarlarını spesifik

olmayan anyon taşıyıcıları vasıtasıyla kolaylıkla geçebilmektedir. Ayrıca, krom bileşikleri arasında Cr(V)'in esas kanserojenik form olduğu öne sürülmüştür. CrO_4^{3-} iyonunun dekompozisyonu sonucu DNA hasarıyla sonuçlanan reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Hücrel indirgeyiciler ile Cr(VI)'nın indirgenmesiyle üretilen Cr(V) komplekslerinin, hidrojen peroksit varlığında, Cr(V)-katalizli Fenton tipi tepkimeyle hidroksil radikallerinin üretimini artırarak Cr(VI) sitotoksitesine neden olduğu söylenmektedir.



Fizyolojik pH'da, Cr(III)'ün hidrojen peroksit ile inkübasyonu, hidroksil radikali oluşumuna yol açmaktadır. Literatürdeki veriler, Cr(III)'ün hem hidrojen peroksit hem de lipid hidroperoksitlerden serbest radikal üretebildiğini göstermektedir (Stohs ve Bagchi, 1995).

Cıva, toksik bir metal olup, serbest sülfhidril gruplarıyla tepkimeye girme ve bunları tüketme yeteneği iyi bilinen bir özelliğidir. Cıvanın elementel, inorganik ve organik formlarının nörotoksisite, nefrotoksisite ve gastrointestinal toksisite gibi toksikolojik etkileri bulunmaktadır. Madencilik, döküm ve endüstriyel deşarj sonucunda meydana gelen çevresel bulaşma yoluyla birincil düzeyde cıva toksitesine maruz kalınmaktadır. Cıva, böbrek tübüllerinde glutatyonun tükenmesine neden olmasının yanı sıra süperoksit anyonu ve hidroperoksitlerin peroksidatif etkisine karşı hücrelerin korunmasından sorumlu olan SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinde azalmaya sebep olmaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995).

Nikel, takı ve madeni paralar da dahil olmak üzere sayısız metal üründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu elementin, nikel rafineri çalışanlarında, burun ve akciğer kanseri oluşumuna neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Sıçanlara nikel uygulanmasının, lipid peroksidasyonu ve doku demir seviyelerinde artış, glutatyon peroksidaz aktivitesinde ise azalmaya neden olduğu görülmüştür. Serbest demir açığa çıkması sonucu Fenton tepkimesi yoluyla doku hasarları meydana geldiği bilinmektedir. Bu bağlamda nikelin oksidatif hasar

konusunda dolaylı etkisinin olduğu söylenebilir. İnorganik nikel klorürün, DNA bozunma ürünleri oluşturduğu, hepatik DNA sarmalı kırılımlarına yol açtığı, kromozom sapmaları ürettiği ve lipid peroksidasyonunu başlattığı bilinmektedir (Valko ve diğ., 2006; Stohs ve Bagchi, 1995).

Kurşun, hematolojik, gastrointestinal ve nörolojik işlev bozukluğuna neden olan önemli bir çevresel toksindir. Kurşuna uzun süre maruz kalma, aynı zamanda üreme bozukluğu, hipertansiyon ve nefropatiye sebep olabilir. Bunların dışında kurşun, sinir iletimini yavaşlatır, kalsiyum homeostazı değiştirir, enzimleri inhibe eder ve bağlayıcı proteinlerin sentezini uyarır. Kurşuna başlıca, toz, su, boya, kozmetik ve gıda takviyeleri yoluyla maruz kalınmaktadır. Kurşun bir geçiş metali olmamasına rağmen, peroksidatif tepkimelerde katalizör görevi görmesi bu metalin toksik etkisine büyük katkı sağlamaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995).

Alüminyum, esansiyel olmayan ve redoks inaktif bir metal olup, hem *in vivo* hem de *in vitro* prooksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Bir dizi redoks inaktif metalin susuz ortamda süperoksit-metal kompleksleri oluşturduğu elektron paramanyetik rezonans (EPR) tekniği ile gösterilmiştir. Bu komplekslerin oksidatif gücü, metal ve $O_2^{\cdot-}$ arasındaki bağlanma enerjisi ile doğrusal olarak ilişkilidir ve aynı zamanda metallerin Lewis asiditesini ($M^+ < M^{2+} < M^{3+}$) ve aynı oksidasyon basamağındaki metallerin iyon yarıçaplarını yansıtmaktadır.



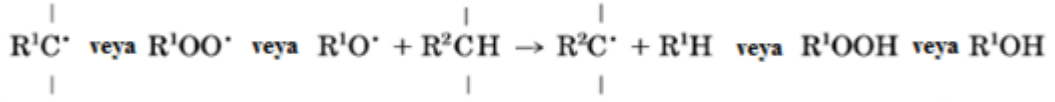
Süperoksit anyon radikalini bağlayarak, Fe(III)'ün Fe(II)'ye geri indirgenmesi için bir redoks döngüsünü mümkün kılabilen alüminyum, süperoksit yarı indirgenmiş radikal iyonunu ($AlO_2^{\cdot 2+}$) oluşturmaktadır. Bu redoks döngüsü Fenton tepkimesini kolaylaştıran, H_2O_2 ile oksidasyona elverişli olan Fe(II) derişiminin korunmasına yardımcı olarak bir prooksidan etki göstermektedir (Exley, 2004).

2.5.PROTEİN OKSİDASYONU

Oksidatif stres, bazı patolojik koşullar ve yaşlanma süreçlerinde proteini oksidatif hasara uğratmaktadır. Yapılan çalışmalarda protein modifikasyonunun temel olarak $\cdot\text{OH}$ radikali ile gerçekleşen tepkimeler sonucunda meydana geldiği gösterilmiştir. Proteinlerin serbest radikal hasarlarından ne derecede etkileneceği, proteinin amino asit kompozisyonuna bağlı olarak değişmektedir. Özellikle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi doymamış bağ ve kükürt ihtiva eden amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenmektedirler (Netto ve diğ., 2002). Proteinlerde prolin, histidin, arginin, lisin ve sistein kalıntıları, redoks aktif metaller tarafından oksidasyona karşı oldukça duyarlı olduğundan, bir proteinin geçiş metali (demir, bakır gibi)-katalizli oksidasyonu “site-specific” yani bulunduğu bölgede oksidatif hasar şeklinde gerçekleşir. Protein-Fe(II) kompleksi, H_2O_2 ile tepkimeye girerek Fenton tepkimesi sonucunda aktif bir reaktif oksijen türü olan $\cdot\text{OH}$ ve ferril iyonları açığa çıkarır (Valko ve diğ., 2006).

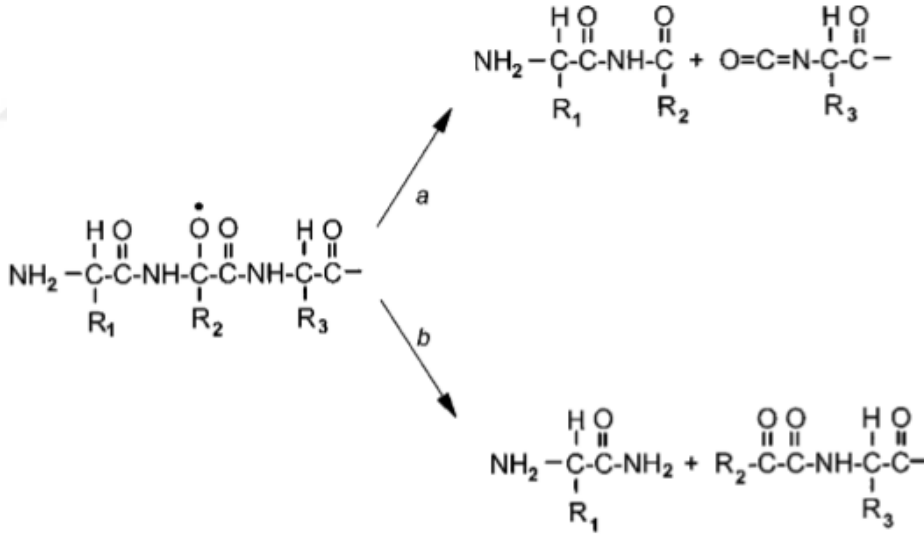
Proteinlerin oksijen varlığında serbest radikal saldırılarına maruz kalması sonucunda hedef moleküllerde çeşitli değişiklikler meydana gelir. ROS türleri; protein zinciri oksidasyonu, protein parçalanması, amino asit yan zincir oksidasyonu ve protein karbonil türevlerinin oluşumu şeklinde çeşitli modifikasyonlara yol açabilmektedir (Berlett ve Stadtman, 1997). Proteinler, organizmadaki bollukları (hücre, plazma ve birçok doku) ve birçok radikalle ya da singlet oksijen gibi uyarılmış türlerle yüksek tepkime hızına sahip olmaları sebebiyle oksidatif hasar konusunda ana hedeflerdir. Oksidasyon tepkimelerinin hızı, örnek sıcaklığına, oksijen ya da katalizör (metal iyonu ve ışık) varlığına ve fiziksel formuna kritik bir şekilde bağlıdır. (Hawkins ve diğ., 2009).

Protein zincirinin oksidasyonu; polipeptid zincirinin oksidatif hasarı, bir amino asit kalıntısında karbon merkezli bir radikal oluşturmak üzere α -hidrojen atomunun $\cdot\text{OH}$ radikali tarafından ayrılmasıyla başlatılır. Bu şekilde oluşan karbon merkezli radikal, alkilperoksil radikal ara maddesi oluşturmak için O_2 ile hızla tepkimeye girer ve bu tepkime sonucunda alkil peroksit oluşabilir. Bunu takiben, hidroksil protein türevine dönüşebilen, bir alkoksil radikali meydana gelir. Bahsedilen oksidasyon basamaklarındaki tepkimelerin birçoğu Fe(II) veya Cu(I) katalizörlüğünde gerçekleşebilir. Bunun dışında oksijen olmadığı durumlarda karbon merkezli radikal başka bir karbon merkezli radikal ile tepkimeye girerek protein-protein çapraz bağlı türevini oluşturabilir (Berlett ve Stadtman, 1997).



Şekil 2.16: Karbon merkezli radikal oluşumu.

Protein parçalanması; alkoksil radikallerinin üretimi, diamid ya da α -amidasyon yolları vasıtasıyla peptid bağının parçalanması için bir aşama oluşturur. Diamid yolu ile parçalanmada; proteinin N-terminal bölümünden türetilen peptid, C-terminal ucunda bir diamid yapısına sahiptir. Buna karşın C-terminal bölümünden türetilen peptid, N-terminal ucunda bir izosiyanat yapısına sahiptir. Aksine α -amidasyon yolu ile parçalanmada, proteinin N-terminal bölümünden elde edilen peptid, C-terminal ucunda bir amid grubuna sahiptir. Buna karşın proteinin C-terminal bölümünden türetilen peptid parçasının N-terminal ucunda bir N - α -ketoçil türevi bulunur (Berlett ve Stadtman, 1997).



Şekil 2.17: Diamid (a), α -amidasyon (b) yollarıyla protein parçalanması.

Amino asit yan zincirinin oksidasyonu; proteinin sistein ve metiyonin kalıntıları hemen hemen tüm ROS türleri ile oksidasyona karşı hassastırlar. Hafif koşullar altında sistein kalıntıları disülfürlere, metiyonin kalıntıları metiyonin sülfoksit (MeSOX) formlarına yükseltgenirler. Birçok biyolojik sistem, sistein ve metiyoninin yükseltgenmiş formlarını tekrar eski formlarına dönüştürülebilen disülfür redüktaz ve metiyonin sülfoksit redüktaz enzimlerini

içermeyenlerden yine daha fazla protein karbonili oluşturduğu söylenmektedir. Bu sonuçlar yeşil çay kateşinlerinin protein karbonili oluşturmasında en önemli yapının öncelikle B halkasındaki galloil grubu, sonra pirogallol grubu olduğunu göstermektedir (Galati ve O'Brien, 2004).

2.6.PROTEİN ÇÖKTÜRME TEKNİKLERİ

Protein çöktürme, hızlı örnek temizleme ve protein-ilaç bağlanmasını bozmak gibi nedenlerle yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı protein çöktürme tekniğini serum ve plazmada bulunan ilaçların analizinde kullanmıştır. Genellikle çöktürücü seçimi ve kullanılan optimum çöktürücü hacmi araştırmacılar arasında farklılık göstermektedir. Literatürde biyolojik numunelerden proteinin uzaklaştırılması amacıyla, proteinin çözünürlüğünün değiştirilmesi için, organik çözücü, asit, tuz veya metal iyonu kullanımına dayanan farklı protein çöktürme teknikleri mevcuttur. Protein çöktürme prosedürlerinin, hızlı, biyolojik numunelerde kolayca kullanılabilme ve geniş bir analit yelpazesinde uygulanabilme gibi özellikleri sağlaması istenmektedir.

Protein çözünürlüğü, sulu çözücü ile polar etkileşimler, tuzlarla iyonik etkileşimler ve benzer yüklü moleküller arasındaki itici elektrostatik kuvvetler arasındaki ilişkiye bağlı olarak değişmektedir. İzoelektrik noktada (pI), bir protein üzerinde net bir yük yoktur ve dolayısıyla protein, sulu çözücü içinde minimum çözünürlüğe sahiptir. Bir protein pI'nin üstünde negatif yüklü olup, pI'nın altında pozitif yüklüdür. Çöktürücü maddelerin, proteinlerin çözelti ortamından çöktürülmesini kolaylaştırmak için spesifik etkileri bulunmaktadır.

Organik çözücüler: Metanol, etanol, asetonitril, aseton ve kloroform gibi organik çözücüler, plazma protein çözeltilisinin dielektrik sabitini düşürerek yüklü moleküller arasındaki etkileşimi ve elektrostatik protein etkileşimlerini kolaylaştırmaktadır. Organik çözücü aynı zamanda protein yüzeyindeki hidrofobik bölgelerin etrafındaki düzenlenmiş su moleküllerinin yerini almaktadır. Metanol, etanol gibi organik çözücüler, plazma proteinlerinin uzaklaştırılmasında nispeten düşük bir verimliliğe sahip olmalarına karşın, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) mobil fazlarıyla uyumlu olduklarından biyoanalizlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Asidik ayıraçlar: Trikloroasetik asit (TCA), perklorik asit (PA) gibi asidik ayıraçlar protein moleküllerinin pozitif yüklü amino gruplarıyla izoelektrik nokta değerinin altındaki pH'larda çözünmeyen tuzlar oluşturmaktadırlar.

Tuzlar: Proteinlerin amonyum sülfat gibi bir tuzun yüksek derişimindeki çözeltisiyle çöktürülmesinde tuzlama etkisi yaratarak, tuz iyonları hidratlanmakta ve mevcut su molekülleri azalmaktadır. Bu durumda suyun proteinin hidrofobik yüzeylerinden uzaklaşması, protein-protein hidrofobik etkileşmesi sonucu protein moleküllerinin agregasyonuna neden olmaktadır.

Metal çöktürücüler: Çinko (çinko sülfat), kalsiyum (kalsiyum klorür), alüminyum (alüminyum nitrat, $Al(NO_3)_3$) gibi pozitif yüklü metal iyonlarının bağlanmasıyla izoelektrik nokta (pI) değişerek proteinin çözünürlüğü azalır. Metal iyonları, amino asitler üzerindeki koordinasyon bağlama alanları için çözelti protonları ile rekabet halindedir. Metal iyonları bağlama bölgelerinde daha güçlü bağlanma yaparak protonlarla yer değiştirirler ve çözelti pH'sının düşmesine neden olurlar. Proteinin pI'sının değiştirilmesi ve pH'nın düşürülmesi kombinasyonu genellikle proteinlerin çöktürülmesini sağlamaktadır (Polson ve diğ., 2003; Souverain ve diğ., 2004; Biddlecombe ve Pleasance, 1999; Jiang ve diğ., 2004; Dhara, 2005).

2.7.PROOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

2.7.1.Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi

İlk olarak 1978'de Buege ve Aust (1978) tarafından uygulanan TBARS yöntemi, Halliwell (Halliwell ve Gutteridge, 1981; Halliwell ve diğ., 1987) tarafından geliştirilmiş olup, genellikle biyolojik örnekler ve gıda maddelerindeki lipid peroksidasyonu veya oksidatif hasar ölçümlerinde sıklıkla kullanılan en eski yöntem olarak bilinmektedir. Oksidatif hasarın birincil ürünleri olan peroksit karışımları daha sonra çeşitli karbonil bileşikleri üretmektedirler. Üç karbonlu malondialdehit bileşiği bu karbonillerden bir tanesidir.

Bu yöntem oksidasyon sonrasında açığa çıkan malondialdehit bileşiğinin tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimesi sonucu oluşan, pembe renkli kompleksin absorbansının 532 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Basit, kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasına karşın inkübasyon süresinin uzun olduğu TBARS yönteminde, oksidasyon araçları olarak sadece linoleik asit, deoksiriboz veya LDL kullanılabilir. Bu nedenle uygulama alanı oldukça sınırlıdır.

Bu yöntemde en önemli sorun; TBA'nın şekerler, proteinler, amino asitler, aldehitler, nükleik asitler ve bilirubin gibi bileşiklerle etkileşime girerek, MDA'nın kolorimetrik ve florimetrik tayininde bozucu etkiler göstermesidir (Grotto ve diğ., 2007). Yöntemin bir diğer önemli dezavantajı ise MDA'nın en az üç çifte bağ içeren yağ asitlerinden oluşabilmesidir (Laguerre ve diğ., 2007).

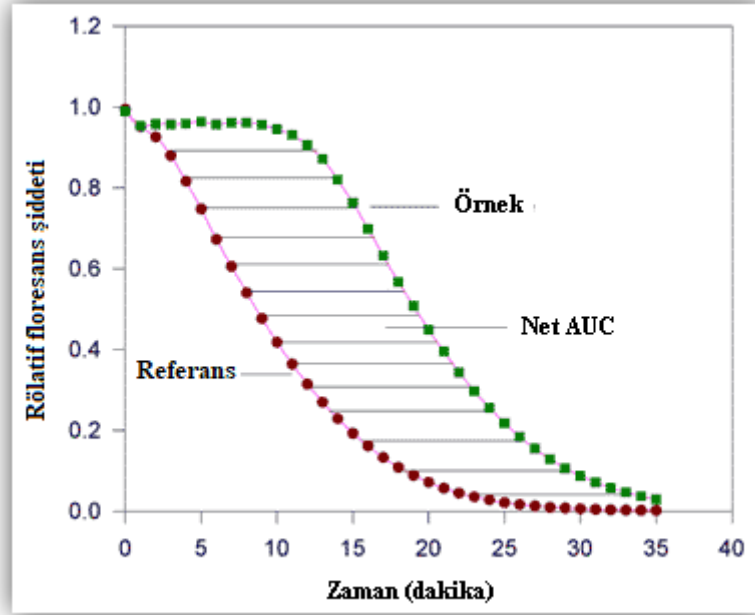
2.7.2.Karbonil Tayini Yöntemi

Protein karbonili genellikle oksidatif stresin bir belirtisi olarak bilinir. Bu bağlamda proteinin oksidatif hasarının bir ölçüsü olarak, proteine bağlı karbonil grupları tayin edilmektedir (Headlam ve Davies, 2004). Bu yöntem, protein veya protein karışımının (plazma, doku homojenizatı, selüler ekstrakt veya izole saf protein) oksidasyonu sonucunda protein yapısında açığa çıkan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları kararlı dinitrofenilhidrazonların (DNP) absorbans değerlerinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (Levine ve diğ., 1994).

Hassas ve ucuz bir yöntem olmakla birlikte 370 nm'de absorpsiyon yapan kromofor grupları ihtiva eden proteinlerin (hemoglobin, miyogloblin, retinoidler vb.) karbonil tayininde güvenilir değildir. Aynı zamanda yöntem sadece protein oksidasyonu sonucunda açığa çıkan karbonil gruplarına değil, karbonil grubu ihtiva eden tüm bileşiklere cevap verdiği için pozitif hataya sebep olmaktadır.

2.7.3.ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi; yükseltgenen substrat olan fikoeritrinin (phycoerythrin, β -PE) reaktif oksijen türleri ile oksidasyonu sonucunda floresansının düşmesi esasına dayanmaktadır (Cao ve diğ., 1997). Çalışmada flavonoidlerin anti- ve prooksidan davranışları ile yapısal aktiviteleri arasındaki ilişki incelenmektedir. Hidrojen atomu transferi (HAT) esaslı olan yöntemde miktar tayininde, eğri altında kalan alan kullanılmaktadır. Yöntemde peroksil radikali kaynağı olarak AAPH, hidroksil radikali kaynağı olarak Cu^{2+} - H_2O_2 kullanılmaktadır. Sonuçlar fikoeritrinin referans ve örnek için azalan floresans eğrisinin altında kalan alanların farkları kullanılarak hesaplanmaktadır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19: Eğri altında kalan net alan (AUC) tekniğiyle ORAC aktivitesinin hesaplanması.

2.7.4. Etidiyum Bromür (EB) Yöntemi

Etidiyum bromür (EB) floresans özellikte bir indikatör olup genellikle DNA hasarı ölçümünde kullanılır. Yöntem, fosfat tamponlu (pH 7.4) ortamda, oksidasyon sonucunda meydana gelen floresans miktarındaki azalma esasına dayanmaktadır (Zheng ve diğ., 2008).

Bu yöntemde referans olarak fenolik asitler dışında DNA ve diğer tüm ayıraçları içeren çözelti %100 floresans, DNA dışındaki referans ise sıfır floresans olarak kullanılmaktadır. Yöntemde 510 nm'de uyarılma ve 590 nm'de emisyon ölçümleri alınmaktadır. Floresans miktarının azalması DNA hasarı olarak ölçülmektedir (Zheng ve diğ., 2006).

2.7.5. Batokuproin Disülfonat (BCS) ve Batofenantrolin Disülfonat (BPS) Yöntemleri

Spesifik olarak bakır(I) ve demir(II) gibi geçiş metal iyonlarının indirgenmiş formlarına cevap veren, sırasıyla batokuproin disülfonat (BCS) ve batofenantrolin disülfonat (BPS) indikatörlerinin kullanılması esasına dayanan yöntem, pH 7.4 tamponlu ortamda DNA hasarı (Yi ve diğ., 2009) veya düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu (Lynch ve Frei, 1995) tayinlerinde kullanılabilir. Bu indikatör moleküller yükseltgenmiş formda bakır (Cu^{2+}) ve demir (Fe^{3+}) iyonları ile renkli yük-transfer kompleksleri vermediğinden Cu(I)-BCS ve

Fe(II)-BPS komplekslerinin sırasıyla 480 ve 535 nm’de maksimum absorpsiyon yapımlarından faydalanılarak kantitatif analizler yapılabilmektedir.

2.7.6.Pirogallol Yöntemi

Süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\cdot-}$) üretildiği yöntem, antioksidan bileşik ve pirogallolün inkübasyonu sonucunda meydana gelen absorbans değişiminin 420 nm’de ölçülmesi ve % inhibisyon değerlerinin hesaplanması esasına dayanmaktadır. Bazı polifenolik bileşiklerin fonksiyonel grupları ile bu grupların yerlerinin değişiminin anti- ve prooksidan özelliklerine olan etkileri pirogallol UV-görünür bölge spektrofotometrik yöntemi ile ölçülmüştür. Anti- ve prooksidan aktivite fenoliklerin ortamdaki derişimlerine bağlı olarak değişmektedir.

2.8.FENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN VE PROOKSİDAN ÖZELLİKLERİ HAKKINDA ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kessler ve diğ. (2003) yaptıkları çalışmada serbest radikal kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılan, özellikle rutin türevlerini içeren, bazı yarı sentetik flavonoidlerin yapısı ile süperoksit, hidroksil ve peroksil radikal süpürme aktiviteleri arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışılan maddeler, rutin, aglikonu olan kuersetin ile bunların metil etil ve hidroksil etil türevleridir. 7 pozisyonundaki hidroksil grubunun alkillenmesinin süpürmeyi artırdığını, buna karşın Fenton tepkimesi ortamında bazı kuersetin türevlerinin, 3 pozisyonundaki serbest hidroksil grubunun veya serbest kateşol grubunun, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit üretimi vasıtasıyla prooksidan aktivite sergilediğini belirlemiştir. Flavonoidlerin bazı tepkime koşullarında prooksidan aktivite gösterebilmeleri nedeniyle, saf antioksidanlar olarak kabul edilemeyeceğini ifade etmişlerdir.

Bir çalışmada (Sugihara ve diğ., 1999) lipid hidroperoksit (LOOH) kaynaklı lipid peroksidasyonu ölçümü için α -linolenik asit yüklü hepatositlere, 20-500 μ M derişim aralığında Fe, Cu, V veya Cd iyonları eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir: Morin hariç mirisetin, kuersetin, fisetin ve kamferol gibi flavonoller, tüm metal derişimlerinde metal kaynaklı lipid peroksidasyonunda doz bağımlı antioksidif aktivite göstermiştir. Etkinlikleri metal iyonuna bağlı olmasına rağmen, en etkin antioksidanlar, mirisetin, kuersetin ve fisetin olarak bulunmuştur. Kamferol ve morin, Cu iyonu varlığında diğer flavonollere eşit antioksidan

aktiviteye sahip olmalarına karşın diğer üç metal iyonu varlığında daha az etkili oldukları tespit edilmiştir. Flavonlardan luteolin, apigenin ve krisin, düşük Fe derişimlerinde antioksidatif etki göstermişken, yüksek Fe derişimlerinde prooksidan aktiviteye sahiptirler. Luteolin, diğer üç metal iyonunun varlığında da kateşol içeren flavonollere benzer antioksidan aktivite sergilemiştir. Ayrıca apigenin ve krisin sırasıyla V veya diğer tüm metal iyonlarıyla prooksidan davranış sergilemişlerdir. Bir flavanon olan taksifolin, Fe derişimine bağılı olarak hem anti- hem de prooksidan aktiviteye sahipken, diğer metallerle birlikte sadece antioksidatif etki göstermiştir. Bir flavanol olan epigallokateşin, kateşol içeren flavonollere benzer etkinliğe sahip olup, tüm metal iyonlarıyla antioksidan gibi davranmıştır.

Simić ve diğ. (2007), bazı doğal fenolik bileşiklerin elektrokimyasal oksidasyonları ve lipid peroksidasyonuna etkilerini, döngüsel voltametri kullanarak araştırmışlardır. Test edilen fenoliklerin yapısal analizinde, birden fazla -OH grubu içermesinin serbest radikal süpürme aktivitesi ve elektrokimyasal davranışının belirleyicileri olduğu ifade edilmektedir. Düşük oksidasyon potansiyeline sahip bileşikler (0.45'den daha düşük Epa) antioksidan aktivite göstermesine karşılık, yüksek Epa değerleri (> 0.45) olan bileşikler prooksidan olarak etki etmiştir. Lipid peroksidasyonu ise Fe(II)-esaslı TBARS yöntemi uygulanarak, yüzde inhibisyon hesaplanarak tayin edilmiş olup, pozitif sonuçların antioksidan, negatif sonuçların ise prooksidan aktiviteyi gösterdiği belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre protokateşuik asit, kafeik asit, kuersetin ve rutin bileşiklerinin antioksidan, salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, sirinjik asit, *o*-kumarik asit, *m*-kumarik asit, *p*-kumarik asit bileşiklerinin ise prooksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Soya fasulyesinde bulunan fenolik asitler, sinnamik asitler ve flavonoidler sınıfına ait bileşiklerin, sistematik bir yapı-aktivite ilişkisi araştırması yapılmıştır. Test edilen tüm fenoliklerin, Fe(III) ile kelat yapabildiği ve bölgesel (site-specific) deoksiriboz bozunması (EDTA'sız) üzerindeki inhibe edici etkileri değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, sadece kateşol, pirogallol veya 3-hidroksi-4-karbonil gruplarına sahip olanların, pH 5.5'te Fe(III)'ün kuvvetli kelatlayıcı ve indirgeyicileri olduğu söylenmiştir. Aynı fenoliklerin, DNA (bleomisin yöntemiyle) ve deoksiriboz (EDTA'lı TBARS yöntemiyle) oksidatif hasarını arttırdığı, ancak linolenik asit peroksidasyonunu önlediği söylenmiştir (Moran ve diğ., 1997).

Yapılan bir çalışmada (Fukumoto ve Mazza, 2000) birincil antioksidan aktivitenin belirlenmesine yönelik yöntemler değerlendirilmiştir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve β -

karoten ağartma yöntemleri kullanılmıştır. Anti- ve prooksidan aktivite tayini için bir linoleik asit emülsiyon sisteminde Cu(II)-katalizli malondialdehit üretimi, HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Sentetik antioksidanlardan (BHA ve BHT) farklı olarak çoğu fenolik bileşiğin, düşük derişimlerde prooksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Anti- ve prooksidan aktivite değerlendirmesinde, yüzde 100'ün üstündeki değerler prooksidan, altındaki değerler ise antioksidan aktiviteyi temsil etmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, gallik asit, protokateşuik asit, 3-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, siriñjik asit, ellajik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit, mirisetin, kuersetin, rutin, kamferol, kateşin, epikateşin, naringenin, siyanidin, siyanidin 3-glikozit, siyanidin 3,5-diglikozit, delphinidin, malvidin, malvidin 3-glikozit, malvidin 3,5-diglikozit, pelargonidin, pelargonidin 3-glikozit, pelargonidin 3,5-diglikozit, peonidin, peonidin 3-glikozit, askorbik asit bileşiklerinin prooksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Cao ve diğ. (1997) yaptıkları çalışmada, ORAC yöntemini kullanarak flavonoidlerin antioksidan ve prooksidan davranışları ile yapı-aktivite arasındaki ilişkileri incelemiştir. Yöntemde üç farklı reaktif tür kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla, peroksil radikal üreticisi olarak 2,2'-azobis(2-amidino-propan) dihidroklorür; hidroksil radikali üreticisi olarak Cu(II)-H₂O₂; geçiş metali olarak Cu(II)'dir. Flavon, izoflavon ve flavanon sınıflarından seçilen flavonoidler, peroksil ve hidroksil radikallerine karşı antioksidan etki gösterirken, Cu(II) varlığında prooksidan gibi davranmaktadırlar. Bir flavonoidin antioksidan ve bakır-katalizli prooksidan aktivitesi, iskelet yapısındaki fonksiyonel hidroksil grup sayısına bağlıdır. Genel olarak, hidroksil grubu sayısı arttıkça anti- ve prooksidan aktivitenin arttığı söylenmektedir. Çalışılan bileşikler arasında 5 pozisyonunda tek hidroksil grubuna sahip olanların aktivitesi yokken, 3' ve 4' pozisyonlarında dihidroksil grubuna sahip olanlar ise peroksil radikali absorplama kapasitesi açısından oldukça önemlidir. A ve B halkaları arasındaki konjugasyon, antioksidan aktiviteyi etkilememektedir. Buna karşın, bakır-katalizli prooksidan aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir.

Diyet yoluyla alınan, fenol halkasına sahip polifenolik bileşiklerin prooksidan özellik gösteren fenoksil radikallerini oluşturmak suretiyle peroksidaz tarafından metabolize edilmesi incelenmiştir. Polifenoliklerin GSH varlığında peroksidaz ile metabolize edildiğindeki oksijen aktivasyonu için bulunan katalitik etkinlik sırası; floretin > floridzin > 4,2'-dihidroksi kalkon > *p*-kumarik asit > naringenin > apigenin > kurkumin > resveratrol > izolikuiritigenin > kapsaisin

> kamferol şeklindedir. Askorbat, oksijenle aktivasyon olmaksızın fenoksil radikalleri tarafından ko-oksidasyona uğramıştır. Kateşol halkalı polifenolikler de semikinon radikallerinin bulunduğu ortamda askorbatın ko-oksidasyonu sağlamaktadır. Askorbat ko-oksidasyonu için bulunan katalitik etkinliğin sırası; fisetin, luteolin, kuersetin > eriyodiktiol, kafeik asit, nordihidroguaiaretik asit > kateşin > taksifolin, kateşol şeklindedir. Genelleme yapılacak olursa; fenol halkası içeren polifenolik bileşiklerin kateşol halkası içerenlerden daha fazla prooksidan etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Galati ve O'Brien, 2004).

Zheng ve diğ. (2008) hidroksisinnamik asitlerin (kafeik asit, klorojenik asit, sinapik asit, ferulik asit, 3-hidroksisinnamik asit ve 4-hidroksisinnamik asit) jel elektroforezi ile DNA zincir kırılımı ve etidiyum bromür yöntemiyle floresans ölçümleri olarak, Cu(II) varlığında DNA hasarı çalışmışlardır. *Orto*-dihidroksi grubu (kafeik asit ve klorojenik asit) veya 4-hidroksi-3-metoksi fonksiyonel grubu (sinapik asit ve ferulik asit) ihtiva eden bileşiklerin DNA hasarında bu grupları içermeyen bileşiklere kıyasla belirgin bir şekilde daha yüksek aktivite sergilediği bulunmuştur. Hidroksisinnamik asitler ve Cu(II) arasındaki elektron transferinin oksidatif potansiyeli ile DNA hasarı arasında yüksek bir korelasyon bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan bileşiklerin DNA hasarı sıralaması, kafeik asit > sinapik asit > klorojenik asit > ferulik asit şeklindedir.

Zheng ve diğ. (2006) etidiyum bromür yöntemini kullanarak fenolik asitlerin prooksidan aktivitelerinin tayini için Cu(II) iyonu varlığında DNA'ya verilen hasar miktarı üzerine çalışmışlardır. Kafeik asit ve klorojenik asit gibi *o*-dihidroksi grupları veya sinapik asit ve ferulik asit gibi 4-hidroksi-3-metoksi grupları ihtiva eden bileşikler DNA hasarında daha yüksek aktivite göstermişlerdir. Kontrol olarak fenolik asitler dışında DNA ve diğer tüm ayıraçları içeren çözelti %100 floresans, DNA dışındaki referans ise sıfır floresans olarak kullanılan yöntemde 510 nm'de uyarılma ve 590 nm'de emisyon ölçümleri alınmıştır. Floresans miktarının azalması DNA hasarı olarak ölçülmüştür.

Samra ve diğ. (2011) askorbik asit, kafeik asit, kuersetin, kateşin, hesperetin ve bu bileşiklerin ekimolar ikili karışımlarının elektrokimyasal davranışlarını döngüsel voltametri, antioksidan etkinliklerini ise luminol-esaslı Co(II)-EDTA kemilüminesansı yöntemlerini kullanarak incelemiş ve prooksidan davranışları veya sinerjik etkilerini değerlendirmişlerdir. Özellikle kuersetin ve kateşin arasında önemli bir sinerjik oksidasyon gözlenmiştir. Kafeik asit-askorbik asit karışımının, çalışılan tüm bileşikler ve karışımların arasında, en yüksek prooksidan

aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen diğer sonuçlara göre, askorbik asit, kuersetinin antioksidan aktivitesini arttırmış olup kateşininkini azaltmıştır. Kateşin ve kafeik asitin antagonistik etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Ahsan ve diğ. (1999) kurkumin bileşiğinin Cu(II) varlığında özellikle hidroksil radikali olmak üzere reaktif oksijen türleri üreterek DNA zincir kırılımlarını incelemiştir. Bu bağlamda kurkuminin hem antioksidan hem de prooksidan etkisinin olduğunu bildirmiştir. Kurkuminin çeşitli biyolojik özelliklerinin kimyasal temelini anlayabilmek amacıyla, kurkumin ile onun doğal olarak oluşan iki türevi (demetoksikurkumin (dmC) ve bisdemetoksikurkumin (bdmC)) arasındaki yapı-aktivite ilişkileri incelenmiştir. Kurkuminin, Cu(II)'yi indirgeyici ve DNA kırılımları tepkimelerinde en etkili form olduğu belirtilmiştir. Üç kurkuminoid tarafından hidroksil radikali oluşma oranı benzerlik göstermiştir.

Kateşin, hesperidin, ferulik asit ve kuersetin olmak üzere dört fenolik bileşiğin antioksidan kapasitesinin *in vitro* değerlendirilmesi; Cu(II)-katalizli TBARS yöntemi kullanılarak düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe etme yetenekleri incelenerek gerçekleştirilmiştir. Tek başlarına ve çeşitli derişimlerde LDL örneklerine katılan kateşin, hesperidin, ferulik asit ve kuersetin çözeltileriyle yapılan denemeler sonucunda derişime bağlı olarak polifenolik bileşiklerin hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteleri olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kateşin ve hesperidin çoğunlukla antioksidan aktiviteye (sırasıyla % 51.1 ile % 76.9) sahipken, ferulik asit ve kuersetin ise prooksidan aktiviteye (sırasıyla % 166.4 ile % 191.8) sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte kuersetinin 2 µM derişimde antioksidan, 4.3 µM derişimde prooksidan aktiviteye sahip olduğunu ve sentetik karışımların aktivitelerinin toplamsal olmadığını ifade etmektedirler (Cirico ve Omaye, 2006).

Askorbik asit ve gallik asitin prooksidan aktivitesinin tayini için Fe(III)-katalizli deoksiriboz oksidasyonu ölçümüne dayanan bir yöntemin kullanıldığı çalışmada (Yen ve diğ., 2002), derişimin artmasıyla bu iki bileşiğin indirgeme gücünün arttığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, askorbik asit ve gallik asitin sırasıyla, 0.82 mM ve 0.6 mM derişimlerde (% 14.8 ve % 28.8 DNA hasarına tekabül eden) maksimum DNA hasarı sergileyerek prooksidan etki gösterdiği ifade edilmiştir. Askorbik asit ve gallik asitin prooksidan aktivitelerinin, metal kelatlayıcı özelliklerinden ziyade güçlü indirgeme gücüne sahip olmalarından kaynaklandığı belirtilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada (Huang ve Frankel, 1997), yağlarda meydana gelen konjuge dien hidroperoksit ölçümü esasına dayanan bir yöntemle, kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat bileşiklerinin anti- ve prooksidan aktiviteleri incelenmiştir. Referans bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yağ-su emülsiyon sisteminde tüm çay kateşinleri ile gallik asidin 5 ve 20 μM derişimlerde hidroperoksit üretimini arttırarak prooksidan etki gösterdiği belirlenmiştir.

Magnani ve diğ. (2000) pirogallol yöntemiyle fenolik bileşiklerin antioksidan ve prooksidan aktivitelerini tayin etmişlerdir. Her bir % inhibisyon, SOD kalibrasyon doğrusu kullanılarak mmol L^{-1} SOD eşdeğeri cinsinden tekrar hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pozitif sonuçlar antioksidan aktivite, negatif sonuçlar ise prooksidan aktivite olarak ifade edilmiştir. Her bileşğin antioksidan aktivitesi SOD'nin pirogallole olan etkisi ile karşılaştırılmıştır. Kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasına rağmen pirogallol yöntemi fizyolojik pH'da çalışmamakta, alkali ortamda çalışmaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.KULLANILAN CİHAZLAR

Bu tez çalışmasında; kimyasal maddelerin ve bitki örneklerinin tartımı için Shimadzu marka ATX224 model analitik terazi, tartılan kimyasalların çözünmesi veya ekstraksiyon işlemleri için Bandelin Sonorex model ultrasonik banyo, inkübasyon çözeltilerinin karıştırılmasında Select marka girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde Inolab marka pH7110 model pH-metre, yumurta akı proteinlerinin çöktürülerek ayrılması işlemi için Electromag marka M4812PII model santrifüj, inkübasyon çözeltilerinin karıştırılması için Biosan marka Multi Bio RS-24 model rotatör, absorbans ölçümünde Varian Cary 1E UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için 1 çift 1 cm ışımaya yoluna sahip Hellma kuartz küvet kullanılmıştır.

3.2.KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler: (-) epikateşin (ECAT) ve klorojenik asit (CLA): Sigma (Steinheim, Germany); neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc) ve kuersetin (QUE): Aldrich (Steinheim, Almanya); sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), (+) kateşin (CAT) hidrat, gallik asit (GA), askorbik asit (AA), metanol (MeOH), etanol (EtOH), asetik asit ve hidroklorik asit: Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya); bakır(II) sülfat, ferrozin (5,6-difenil-3-(2-piridil)-1,2,4-triazin-4',4''-disülfonik asit mono sodyum tuzu) ve mirisetin (MYR): Fluka (Buchs, Switzerland); kalsiyum klorür ve amonyum demir(III) sülfat: Merck (Darmstadt, Almanya); amonyum asetat, sodyum asetat trihidrat ve disodyum hidrojen fosfat: Riedel-de Haën (Steinheim, Almanya). Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

3.3.ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Bakır(II) sülfat çözeltisi, 10^{-3} M olacak şekilde 0.0125 g tartım alınıp distile su ile çözülmesinin ardından hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 7.4 olacak şekilde 0.2 M'lık primer ve sekonder fosfat çözeltileri ile hazırlandı.

Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1.0 M (pH 7.0) olacak şekilde gerekli tartım alınıp distile su ile çözülerek hazırlandı.

Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.078 g tartım alınıp etanolde çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Asetat tamponu ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$), pH 5.5 olacak şekilde 0.2 M'lık asetik asit ile sodyum asetat çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

Demir(III) çözeltisi, 2.0×10^{-3} M derişim için gerekli tartım alındıktan sonra distile suda çözüldü, 1 mL 1.0 M HCl ilave edildi ve hacmi distile suyla 50 mL'ye tamamlandı.

Ferrozin çözeltisi, 1.0×10^{-2} M derişim için gerekli tartım alındıktan sonra distile suda çözüldü, 1 mL 1.0 M HCl ilave edildi ve hacmi distile suyla 50 mL'ye tamamlandı.

Çalışılan fenolik bileşiklerin 10^{-2} M'lık stok çözeltileri, kuersetin ve mirisetin hariç distile suda hazırlandı. Kuersetin ve mirisetin stok çözeltileri 3×10^{-3} M olacak şekilde %50 EtOH/ H_2O (v/v) çözücü karışımında çözümlenerek hazırlandı.

DNPH ayracı çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde metanolde, çözünene kadar ısıtılarak hazırlandı.

Kalsiyum klorür çözeltisi, 0.1 M olacak şekilde gerekli tartım alınıp distile suda çözülerek hazırlandı.

3.4.ÇALIŞILAN ÖRNEKLER

3.4.1.Sentetik Karışımlar

Sentetik ikili antioksidan karışım çözeltileri son derişimleri, aşağıda görüldüğü şekilde hazırlandı.

Karışım 1: 0.4 mM ECAT + 0.2 mM CLA

Karışım 2: 4.0 mM AA + 0.1 mM GA

Karışım 3: 4.0 mM AA + 0.1 mM CAT

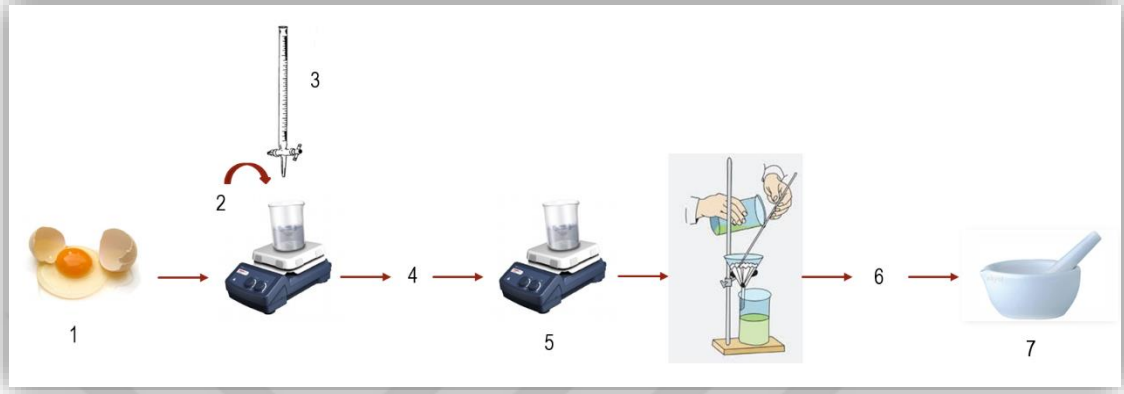
3.4.2. Gerçek Örnekler

Aktardan temin edilen, adaçayı (*Salvia officinalis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), mercanköşk (*Origanum majorana*) ve nane (*Mentha*) bitkilerinden hazırlandı. Şifalı bitki örnekleri, her bir bitki türünden 1 g tartım alınarak 10 mL distile suda 15 dk süresince, oda sıcaklığında, ultrasonik banyoda bekletmek suretiyle ekstrakte edildi. Üst faz dekante edilip ekstraksiyon işlemi sırasıyla 10 mL ve 5 mL olmak üzere 2 kere daha tekrar edildi. Toplamda 45 dakikalık ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen süpernatantlar birleştirilip analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı GF/PET (glass fiber/polietilen tereftalat) mikrofiltreden süzülerek kullanıldı. Ekstraktlar genellikle taze hazırlanmasına karşın gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

3.5. PROTEİN ESASLI KATI PROOKSİDAN SENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI

Hem yapısındaki proteinler, hem de ucuz ve kolay bulunan bir malzeme olması nedeniyle prooksidan aktivite ölçümünde kullanılacak katı biyosensörün hazırlanmasında yumurta akı tercih edildi. Yumurta akında bulunan başlıca proteinler; ovalbumin (% 54), ovotransferrin (% 12), ovomucoid (% 11), lizozim (% 3.5) ve ovomucin (% 3.5)'dir. Ovalbumin yapısında, 4 serbest tiyol (-SH) grubu (sistein, Cys) ve bir disülfür bağı (Cys74-Cys121) bulunmaktadır (Abeyrathne ve diğ., 2013). Proteinler, kalsiyum klorür ile çöktürülerek çözünmeyen bir kalsiyum proteinat kompleksi elde edildi. Sensörün hazırlanmasında, Dhara'nın (2005) çalışması referans alındı. Fakat, Al'un prooksidan rolü (Exley, 2004) ve flavonoidlerle kompleks oluşturduğu (Pekal ve Pyszynska, 2014) bilindiğinden, Al(NO₃)₃ yerine CaCl₂ kullanılarak proteinler çöktürüldü. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi öncelikle yumurta akı sarısından tamamen ayrılarak behere alındı ve son hacim 50 mL olacak şekilde distile su ilave edildi. Karışım homojen hale gelene kadar manyetik karıştırıcıda 500 rpm hızda karıştırıldı. Karışımın üzerine, pH'ı 1.0 M NaOH çözeltisi ile 9,5'a ayarlanmış olan, 100 mL distile su eklenmesinin ardından damla damla 50 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi ilave edildi. Karışım, 2 saat oda koşullarında bekletildikten sonra 1 saat süreyle, 100 °C'de ısıtıldı. Bu sürenin sonunda oluşan Ca-proteinat çökeltisi süzgeç kağıdından süzülerek ayrıldı ve kalsiyum çözeltisi kalıntıları ortamdaki uzaklaşana kadar birkaç kez distile suyla yıkandıktan sonra açıkta kurumaya bırakıldı. Kurumuş protein çökeltisi (protein yapıda katı prooksidan sensörü),

havanda öğütüldü, 710 µm boyutunda elekten geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan sensör, -20 °C'de saklandığında birkaç ay süreyle dayanıklılığını muhafaza etmektedir.



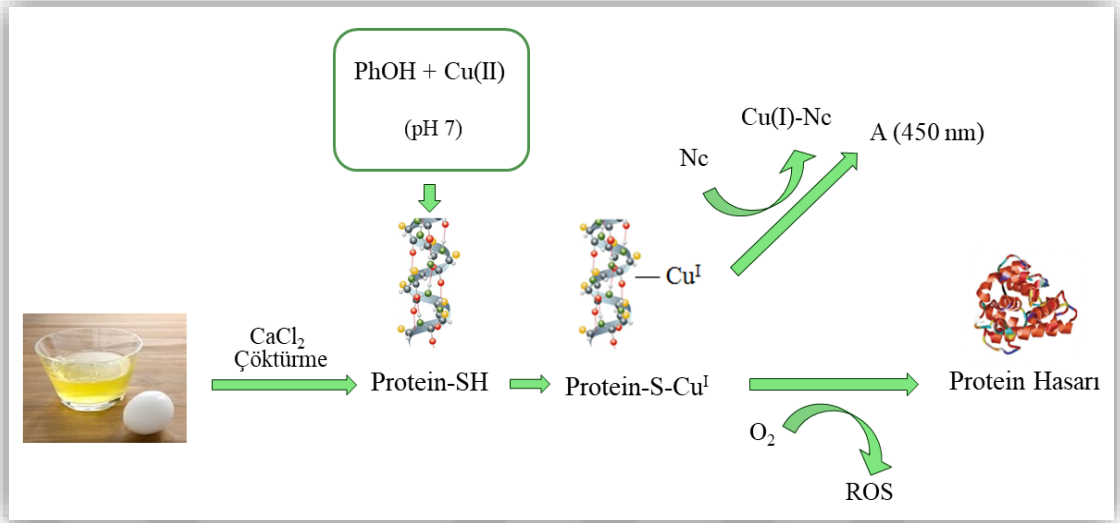
Şekil 3.1: Protein yapısında prooksidan sensörü hazırlanışı.

1- Yumurta akının sarısından ayrılması, 2- pH'ı 9,5 olan 100 mL distile su ilavesi, 3- 50 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi ilavesi, 4- İki saat oda koşullarında bekletme, 5- 1 saat 100 °C'de ısıtma, 6- 1 gün süreyle açıkta kurutma, 7- Havanda öğütme.

3.6.UYGULANAN PROOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

3.6.1.Biyosensör Esaslı Cu(II)-Neokuproin Yöntemi

Anabilim dalımızda geliştirilen ve CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) adıyla literatüre kazandırılan toplam antioksidan aktivite (TAK) yöntemi (Apak ve diğ., 2004) ayırıcı Cu(II)-Nc, prooksidan aktivite tayini için protein yapısında katı biyosensör esaslı spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesinde kullanıldı. Bu yöntem proteinin tiyol gruplarına bağlandığı düşünülen bakır iyonunun (protein-Cu(I)) neokuproin ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



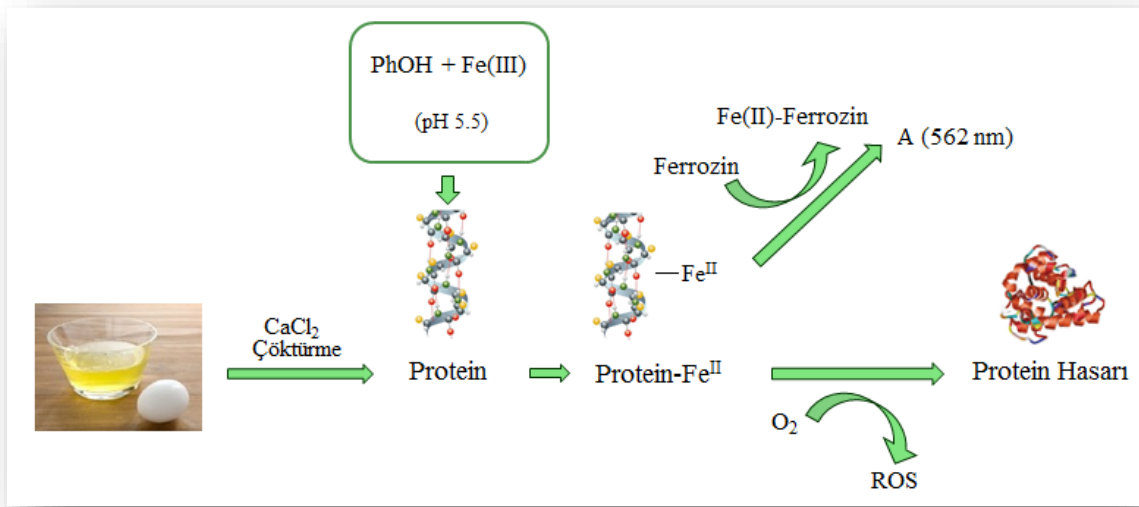
Şekil 3.2: Protein-esaslı sensör kullanılarak Cu(II)-Nc yöntemi ile toplam prooksidan aktivite tayini.

Yöntemin uygulanışı şu şekildedir; bir santrifüj tüpüne 50 mg protein yapısındaki katı prooksidan sensörü tartıldı. Üzerine 1 mL pH 7.4 fosfat tamponu, 1 mL Cu(II) çözeltisi, 1 mL çeşitli derişimlerdeki fenolik bileşik çözeltisi veya şifalı bitki ekstraktı ilave edildi ve hacmi distile suyla 4 mL'ye tamamlandı. Çözelti karışımları vortekste karıştırıldıktan sonra 30 dk süresince rotatörde karıştırılarak inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüpler 2 dk 5000 rpm hızda santrifüj edilerek çökelti ve sulu faz ayrıldı. Sulu faz dekante edilip ortamdan ayrıldıktan sonra sensör 3 defa 5'er mL distile su ile yıkandı. Prooksidan sensörü üzerine 1 mL Nc çözeltisi, 1 mL NH_4Ac tamponu (pH 7.0) ve 2 mL distile su ilave edildi. Karışımlar vorteks ile karıştırılıp, rotatörde, oda sıcaklığında 20 dk süre ile inkübe edildi. Bu sürenin sonunda karışımlar, GF/PET mikrofiltre kullanılarak süzüldü ve örnek haricindeki tüm çözeltileri içeren referansa karşı, 450 nm'de absorbansları ölçüldü (Şekil 3.2).

Fenolik bileşiklerin prooksidan aktivitelerini belirlemek için 0.25 ile 2500 μM arasında geniş bir derişim aralığında çalışıldı. Katı biyosensör kullanımına dayanan yöntemin uygulanması sonucunda, çalışılan bileşiklerin, 2.50 μM derişimin üzerinde prooksidan aktivite gösterdiği belirlendi. Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemiyle ölçülen absorbans değerleri ile derişim arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinden doğru denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları belirlendi.

3.6.2. Biyosensör Esaslı Fe(III)-Ferrozin Yöntemi

Anabilim dalımızda geliştirilmiş olan ve demir(III) indirgeyici antioksidan kapasite adıyla literatüre kazandırılan TAK yöntemi (Berker ve diğ., 2010) ayırıcı Fe(III)-Fz, prooksidan aktivite tayini için protein yapısında katı biyosensör esaslı spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesinde kullanıldı. Bu yöntem, protein yapısına özellikle oksijen ve azot üzerinden bağlandığı düşünülen (Ilari ve diğ., 2000) demir(II) iyonunun ferrozin ile oluşturduğu Fe(II)-Fz kelatının 562 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



Şekil 3.3: Protein-esaslı sensör kullanılarak Fe(III)-Fz yöntemi ile toplam prooksidan aktivite tayini.

Yöntemin uygulanması şu şekildedir; bir santrifüj tüpüne 50 mg protein yapısındaki katı prooksidan sensörü tartıldı. Üzerine 2 mL pH 5.5 asetat tamponu, 1 mL Fe(III) çözeltisi, 1 mL çeşitli derişimlerdeki antioksidan çözeltisi veya şifalı bitki ekstraktı ilave edildi ($V_{\text{son}} = 4 \text{ mL}$). Çözelti karışımları vortekste karıştırıldıktan sonra 30 dk süresince rotatörde karıştırılarak inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüpler 2 dk 5000 rpm hızda santrifüj edilerek çökelti ve sulu faz ayrıldı. Sulu faz dekante edilip ortamdaki ayrıldıktan sonra sensör, 3 defa 5'er mL distile su ile yıkandı. Prooksidan sensörü üzerine 1 mL ferrozin çözeltisi, 2 mL asetat tamponu (pH 5.5) ve 2 mL distile su ilave edildi. Karışımlar vorteks ile karıştırıldıktan sonra rotatörde, oda sıcaklığında, 30 dk süre ile inkübe edildi. Bu sürenin sonunda karışımlar, GF/PET mikrofiltre

kullanılarak süzöldü ve örnekle haricindeki tüm çözeltileri içeren referansa karşı 562 nm'de absorbansları ölçöldü (Şekil 3.3).

Fenolik bileşiklerin prooksidan aktivitelerini belirlemek için 0.25 ile 2500 µM arasında geniş bir derişim aralığında çalışıldı. Katı biyosensör kullanımına dayanan yöntemin uygulanması sonucunda, çalışılan bileşiklerin, 2.50 µM derişimin üzerinde prooksidan aktivite gösterdiği belirlendi. Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemiyle ölçölen absorbans değerleri ile derişim arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinden doğru denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları belirlendi.

3.6.3.Modifiye Karbonil Tayini Yöntemi

Karbonil tayini yöntemi, proteinin yapısında bulunan ve oksidatif hasar sonucunda açığa çıkan karbonil gruplarının, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların (DNP), 370 nm'de absorbanslarının ölçölməsi esasına dayanmaktadır (Levine ve diğ., 1994). Tez çalışması kapsamında, katı protein esaslı sensör kullanıldığından yöntem modifiye edilerek {trikloroasetik asit (TCA) ile çöktürme yapılmadan} kullanıldı.

Yöntemin uygulanması şu şekildedir; bir santrifüj tüpüne 50 mg protein yapısındaki katı prooksidan sensörü tartıldı. Üzerine 1 mL pH 7.4 fosfat tamponu, 1 mL Cu(II) çözeltisi, 1 mL çeşitli derişimlerdeki fenolik bileşik çözeltisi veya şifalı bitki ekstraktı ve 1 mL DNPH ayıracı ilave edildi ($V_{son}= 4$ mL). Çözelti karışımları, vortekste karıştırıldıktan sonra 30 dk süresince rotatörde karıştırılarak inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, karışımlar GF/PET mikrofiltre kullanılarak süzöldü ve örnekle haricindeki tüm çözeltileri içeren referansa karşı 370 nm'de absorbansları ölçöldü.

Karbonil tayini yöntemiyle ölçölen absorbans değerleri ile derişim arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinden doğru denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları belirlendi.

Bu yöntem Cu(II) iyonları yerine Fe(III) iyonları kullanılarak da uygulandı. Bir santrifüj tüpüne 50 mg protein yapısındaki katı prooksidan sensörü tartıldı. Üzerine 1 mL pH 5.5 asetat tamponu, 1 mL Fe(III) çözeltisi, 1 mL çeşitli derişimlerdeki fenolik bileşik çözeltisi ve 1 mL DNPH ayıracı ilave edildi ($V_{son}= 4$ mL). Çözelti karışımları, vortekste karıştırıldıktan sonra 30 dk süresince rotatörde karıştırılarak inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, karışımlar GF/PET

mikrofiltre kullanılarak süzöldü ve örneğ haricindeki tüm çözeltileri içeren referansa karşı 370 nm'de absorbansları ölçöldü.



4. BULGULAR

4.1.KATI BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI İŞLEMİNİN OPTİMİZASYONU

Yüksek lisans tez çalışmamda (Kondakçı ve diğ., 2013), yumurta akı çözeltisini kullanarak prooksidan aktivite ölçümü için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştik. Bu çalışmada ise tiyol grupları içeren yumurta akını kullanarak protein yapısında katı bir prooksidan sensörü hazırlamayı, dolayısıyla prooksidan aktivite ölçümü için kullanılacak dayanıklı bir yapı elde etmeyi hedefledik. Yumurta akı, hem kolay temin edilebilmesi hem de tiyol grupları içermesi açısından, böyle bir çalışma için çok avantajlı bir malzemedir.

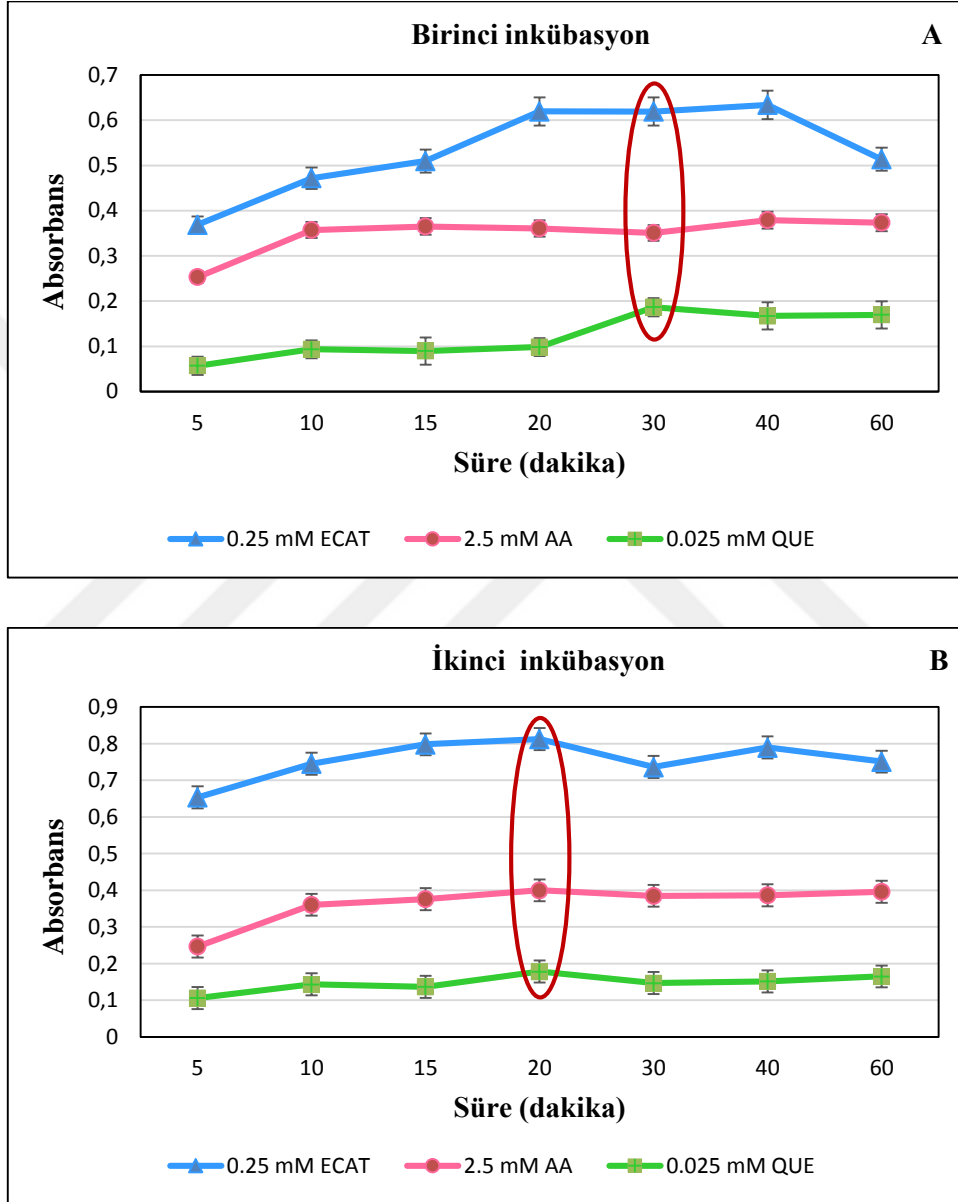
Katı sensörün hazırlanması için $AlCl_3$, $CaCl_2$, EtOH ve TCA ile çöktürme gibi farklı protein çöktürme teknikleri denendi. Alüminyum klorür ile çöktürerek hazırlanan protein sensörünün kullanıldığı çalışmalarda, tutarsız sonuçlar alındı. Al'un prooksidan rolü olduğu (Exley, 2004) ve flavonoidlerle kompleks oluşturma yatkınlığı bulunduğu (Pękal ve Pyrzynska, 2014) da dikkate alınarak bu yöntemden vazgeçildi. Etil alkolle çöktürme işleminde elde edilen protein, elastik bir yapıya sahip olduğundan toz haline getirilemedi. Bu nedenle bu teknik de kullanılmadı. TCA ile çöktürülen protein toz haline getirilebildi, fakat hazırlanan sensörün duyarlılığı oldukça düşük olduğundan bu teknikten de vazgeçildi. Dayanıklı olması ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi nedeniyle sensörün hazırlanmasında $CaCl_2$ ile çöktürme tekniği tercih edildi. Bu amaçla, Dhara'nın (2005) çalışması referans alındı fakat protein çöktürme işlemi, yukarıda açıklamış olduğumuz nedenlerden dolayı, $Al(NO_3)_3$ yerine $CaCl_2$ ile gerçekleştirildi.

4.2.OPTİMUM İNKÜBASYON SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ

4.2.1.Biyosensör Esaslı Cu(II)-Neokuproin Yöntemi için Süre Çalışması

Fosfat tamponlu (pH 7.4) ortamda, 50 mg protein üzerine ECAT (0.25 mM), AA (2.5 mM) ve QUE (0.025 mM) çözeltilerinden biri ilave edilerek her bir antioksidan bileşik için birinci ve ikinci inkübasyon süreleri optimize edildi. Yöntem prosedüründe bahsedilen 1inci inkübasyon; Cu(II)'nin protein ve antioksidan karışımlarında Cu(I)'e indirgenmesi ve proteine bağlanması için gerekli süreyi, 2nci inkübasyon ise proteine bağlanan Cu(I)'in neokuproinin alkollü çözeltisi ile $Cu(Nc)_2^+$ halinde koparılması için gereken süreyi ifade etmektedir. Her iki

inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için biri sabit tutulmak kaydıyla 5-60 dk aralığında farklı sürelerde ölçümler alındı, sonuçlar Şekil 4.1 A ve B’de gösterildi. Şekilde görüldüğü gibi yöntemin uygulandığı 3 antioksidan bileşik için de, 1nci inkübasyon süresi 30 dk, 2nci inkübasyon süresi 20 dk olarak belirlendi.

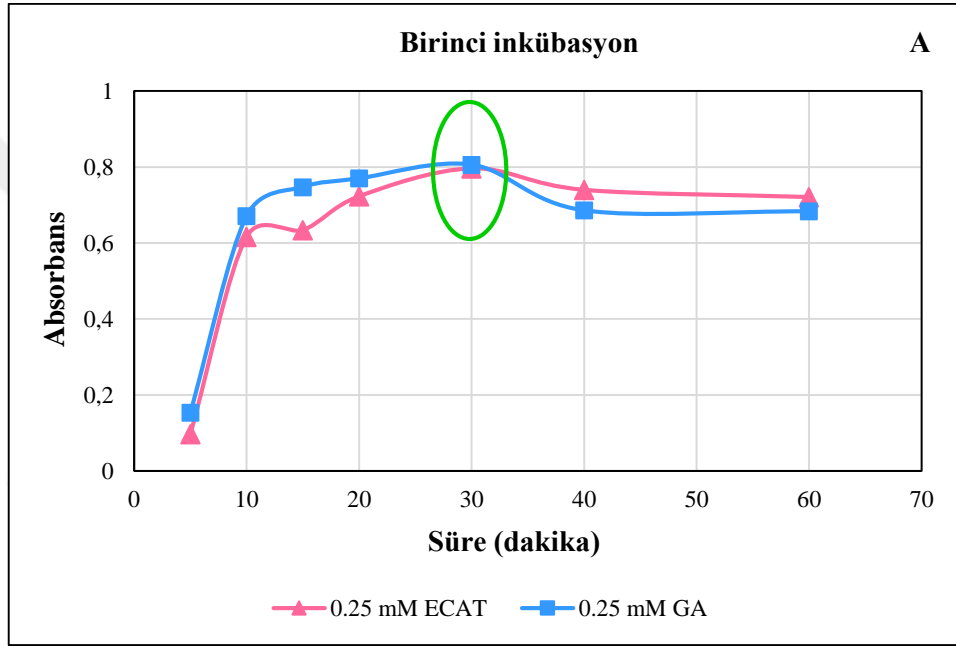


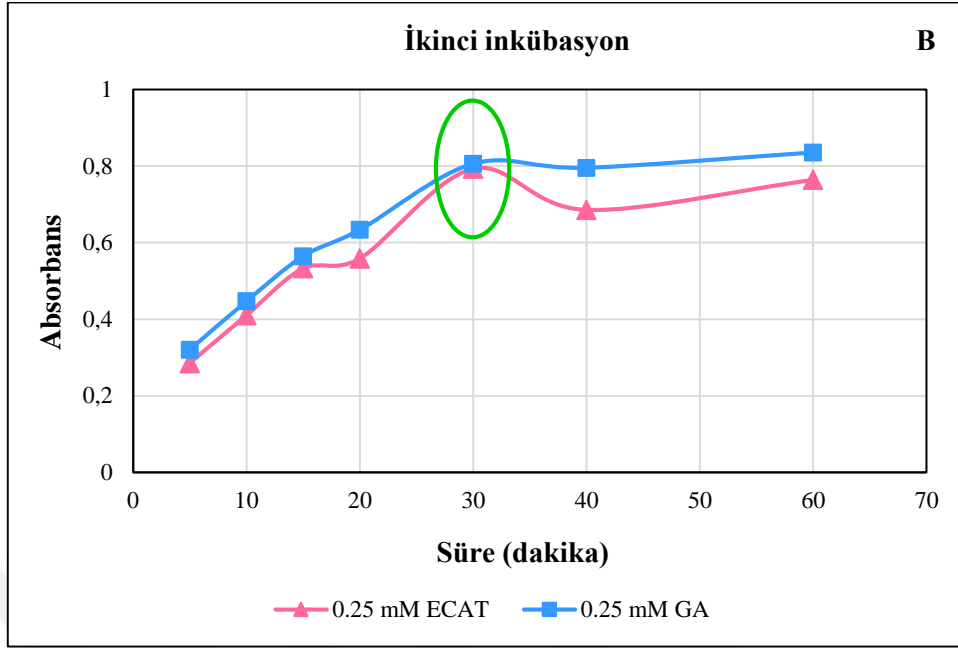
Şekil 4.1: Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yönteminin inkübasyon süreleri optimizasyonu.

{(A)’da ikinci inkübasyon süresi 30 dk, (B)’de birinci inkübasyon süresi 30 dk} (n=3).

4.2.2. Biyosensör Esaslı Fe(III)-Ferrozin Yöntemi için Süre Çalışması

Asetat tamponlu (pH 5.5) ortamda, 50 mg protein üzerine ECAT (0.25 mM) veya GA (0.25 mM) çözeltilerinden biri ilave edilerek her bir antioksidan bileşik için birinci ve ikinci inkübasyon süreleri optimize edildi. Her iki inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için biri sabit tutulmak kaydıyla 5-60 dk aralığında farklı sürelerde ölçümler alındı. Şekil 4.2 A ve B’de görüldüğü gibi her iki inkübasyon için de optimum süre 30 dk olarak belirlendi. Bir önceki çalışmada kullanılan QUE ve AA bu yöntemde cevap vermedikleri için kullanılmadılar.





Şekil 4.2: Biyosensör esaslı Fe(III)-Ferrozin yönteminin inkübasyon süreleri optimizasyonu.

{(A)'da ikinci inkübasyon süresi 30 dk, (B)'de birinci inkübasyon süresi 30 dk} (n=3).

4.3.UYGULANAN PROOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİNİN ANALİTİK PERFORMANSLARI

Standart bileşik olarak seçilen ECAT ile biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemi için hesaplanan, belirtme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik (%RSD) değerleri gibi analitik performans verileri Tablo 4.1'de verildi. Çeşitli antioksidan bileşiklerin (ECAT, CAT, GA, AA, CLA ve QUE), biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemine göre molar derişim-absorbans arasında çizilen grafiklerinden faydalanarak elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri, korelasyon katsayıları (r) ve doğrusal çalışma aralıkları Tablo 4.2'de gösterildi. Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile elde edilen korelasyon katsayıları (r) ve doğrusal çalışma aralıklarıyla modifiye karbonil tayini yöntemiyle elde edilen sonuçlar oldukça farklı bulundu. Bu durumun yöntemlerin farklı mekanizmalarından ileri geldiği düşünülmektedir. Yukarıda adı geçen yöntemlerin çalışılan bileşiklere uygulanması sonucu elde edilen ve bileşiklerin derişimine bağlı olarak absorbans değişimini gösteren grafikler de Şekil 4.3-9'da görülmektedir. Fe(III) iyonu varlığında

gerçekleştirilen modifiye karbonil tayini denemeleri, tekrarlanabilen sonuçlar vermediği, aynı zamanda dalgaboyu kaymaları da oluştuğu için bu yöntem bulguları, sadece Cu(II) iyonu varlığında belirlenen değerlerdir.

Hava ortamında (yani O₂ varlığında) Cu(II) çözeltileri, Haber-Weiss döngüsüyle belirli koşullar altında süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri gibi reaktif türler üretebilir (Gunther ve diğ., 1995). Bu türler, antioksidanlar ile Cu(II) tepkimeye girdikten sonra çözeltide oluşabildiği gibi protein-Cu(I) komplekslerinin (bir "kafes" benzeri sistemde) yakınında da oluşabilir (Cabiscol ve diğ., 2000). Sonuç olarak, protein karbonilleri, her iki ROS saldırısı türü altında oluşabilir. Bu nedenle, protein karbonil üretiminin azaltılması ile antioksidan aktivite testi, muhtemelen antioksidan bileşiklerin ROS süpürme aktivitesinin bir sonucudur. Buna karşılık protein sensörüne uygulanan biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi, yalnızca 'mevkiye özgü' (site spesifik) hasar ölçüsüdür, yani proteine bağlı Cu(I)'den kaynaklanmaktadır. Benzer bir davranış Fe(III) için de beklendi fakat bulgular, bazı bileşikler için (AA, MYR ve QUE) beklenenden farklıydı. Literatürde polifenolik bileşiklerin Fe(III) ve Cu(II) gibi metalleri, Fe(II) ve Cu(I)'e indirgeyerek serbest radikaller oluşturdukları ve bunun sonucunda protein ve DNA oksidatif hasarına neden oldukları belirtilmiştir (Hajji ve diğ., 2006).

Yapılan bir çalışmada, flavonoidlerin metal kelatlama özellikleri incelenmiş ve bu bileşiklerin bakır metalini indirgeme gücünün demirinkinden daha güçlü olduğu ifade edilmiştir (Mira ve diğ., 2002). Ölçümlerin elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi (ESI-MS) ile gerçekleştirildiği çalışmada, demir ve çeşitli flavonoidlerin pH ≤ 5.5 civarında, 1:1 ve 1:2 oranlarında (metal/flavonoid) kompleks yapılar oluşturduğu tespit edilmiştir. Özellikle QUE ile MYR bileşiklerinin oluşturduğu kararlı komplekslerin 4-okso ve 3- ya da 5-hidroksil grupları arasında olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise (Verdan ve diğ., 2011), flavonoidlerin Fenton reaksiyonunu ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$) engelleyerek demir iyonları kaynaklı DNA hasarını önlediği belirtilmiştir. Bu çalışmada, flavonoidlerden olan QUE ve MYR bileşiklerinin demir iyonlarıyla pH 6'da oluşturdukları kompleksler incelenmiş ve bu bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin metal iyonlarını bağlamalarından ileri geldiği ifade edilmiştir. QUE ve MYR'in Fe(III) iyonları ile 3-hidroksi-4-keto veya 5-hidroksi-4-keto üzerinden bağlanabildiğinin belirtildiği çalışmada değerlendirmeler, UV-görünür bölge spektrometrisi ile yapılmıştır. AA'in (flavonoidler kadar olmasa bile) Fe(III) ile kompleks oluşturabildiği bilgisi de literatürde yer almaktadır (Khan ve Martell, 1967; Keypour ve diğ.

1986). Bu değerlendirmeler, Tablo 4.2 ve Şekil 4.3'teki Fe(III) iyonları varlığında AA, MYR ve QUE için prooksidan aktivite ölçümü yapılamamasını açıklamaktadır. Modifiye karbonil tayini yöntemi, Cu(II) katalizli prooksidan aktivite ölçümü için kullanılabilirken Fe(III) varlığında anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Normalde karbonil tayin yöntemi bazık pH'ta uygulandığı için sorunun pH kaynaklı olabileceği düşünüldü. Ayrıca bir çalışmada (Tien ve diğ., 1999), karbonil gruplarının oluşumunda Cu(II) iyonlarının Fe(III) iyonlarından daha etkili olduğu da belirtilmiştir.

Tablo 4.1: Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yönteminin, ECAT standardı kullanılarak belirlenmiş analitik parametreleri.

Parametre	Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi	Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemi	Modifiye karbonil tayini yöntemi
Lineer aralık (μM)	12.5 – 150	25 – 250	50.0 – 250
LOD (μM) ^a	1.2	0.5	3.0
LOQ (μM) ^b	4.0	1.8	10.0
Doğru denklemi ^c	$A = 3472 c + 0.142$	$A = 3264 c - 0.015$	$A = 1394 c + 0.270$
Korelasyon katsayısı (r)	0.9907	0.9999	0.9944
Gün içi kesinlik ^d , % RSD	2.8	1.9	4.3
Günler arası kesinlik ^d , % RSD	3.2	1.9	5.1

^a LOD = $3s_{bl} / m$ (m kalibrasyon doğrusunun eğim değeri ve s_{bl} krn standart sapmasıdır)

^b LOD = $10s_{bl} / m$

^c Absorbans (A) ve derişim (c , mol L⁻¹) arasındaki doğrusal eşitlik

^d 0.25 mM ECAT için (n=3).

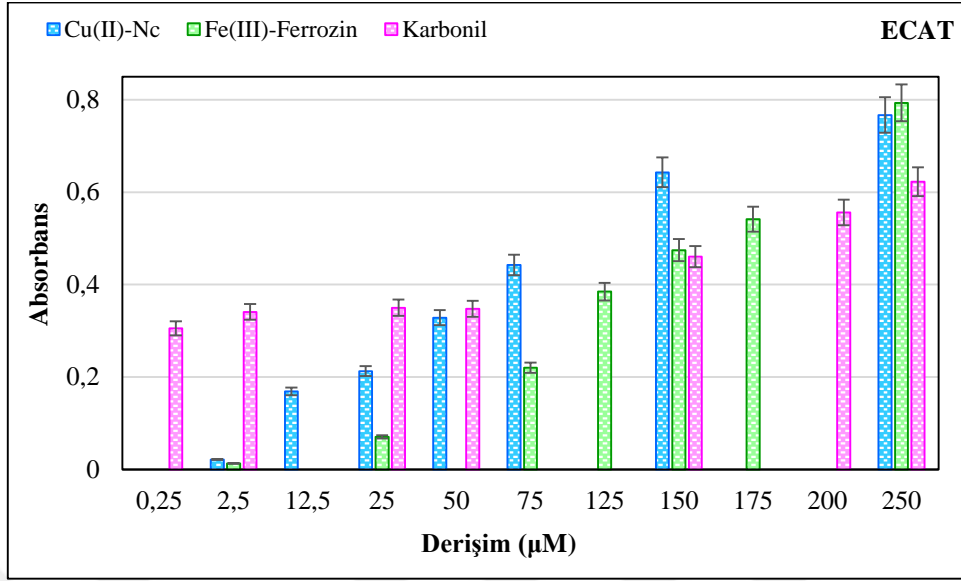
Tablo 4.2: Çalışılan antioksidan bileşiklerin biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, biyosensör esaslı Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemlerine göre elde edilen doğru denklemi, korelasyon katsayısı (r) ve doğrusal aralık (μM) değerleri.

Bileşik	Doğru denklemi	Korelasyon katsayısı (r)	Doğrusal aralık (μM)
ECAT	$A = 3472 c + 0.142^a$	$r = 0.9907$	12.5 – 150
	$A = 3264 c - 0.015^b$	$r = 0.9999$	25 – 250
	$A = 1394 c + 0.270^c$	$r = 0.9944$	50.0 – 250
CAT	$A = 2295 c + 0.201^a$	$r = 0.9996$	25.0 – 250
	$A = 2918 c + 0.035^b$	$r = 0.9999$	25 – 125
	$A = 2043 c + 0.411^c$	$r = 0.9577$	7.5 – 100
GA	$A = 1789 c + 0.225^a$	$r = 0.9996$	25.0 – 175
	$A = 4052 c - 0.037^b$	$r = 0.9999$	25 – 125
	$A = 1447 c + 0.313^c$	$r = 0.9737$	25.0 – 250
CLA	$A = 1250 c + 0.209^a$	$r = 0.9996$	25.0 – 250
	$A = 4498 c - 0.046^b$	$r = 0.9999$	25 – 125
	$A = 2067 c + 0.498^c$	$r = 0.9807$	2.5 – 175
AA	$A = 142 c + 0.068^a$	$r = 0.9998$	250 – 2500
	-	-	-
	$A = 1110 c + 0.535^c$	$r = 0.9193$	12.5 – 500
QUE	$A = 5080 c + 0.035^a$	$r = 0.9853$	2.5 – 22.5
	-	-	-
	$A = 29365 c - 0.091^c$	$r = 0.9515$	2.5 – 22.5
MYR	$A = 711 c + 0.004^a$	$r = 0.9997$	25.0 – 175
	-	-	-
	$A = 371 c + 0.230^c$	$r = 0.9880$	750-3000

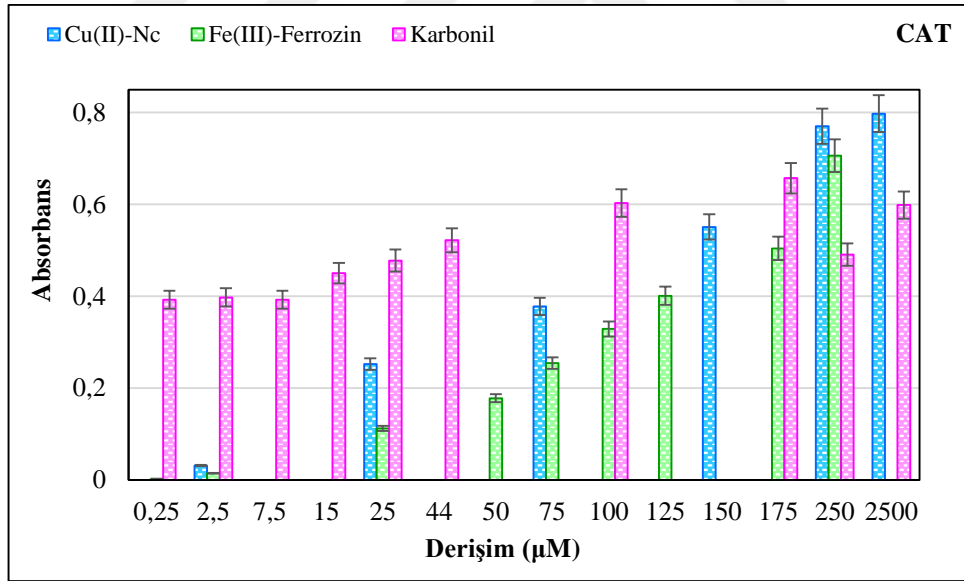
^a Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi

^b Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemi

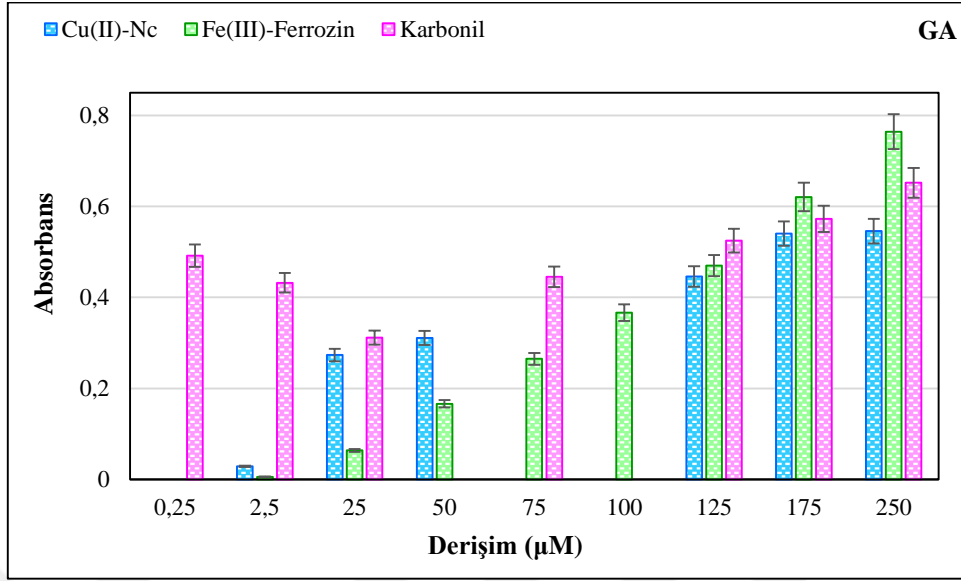
^c Modifiye karbonil tayini yöntemi



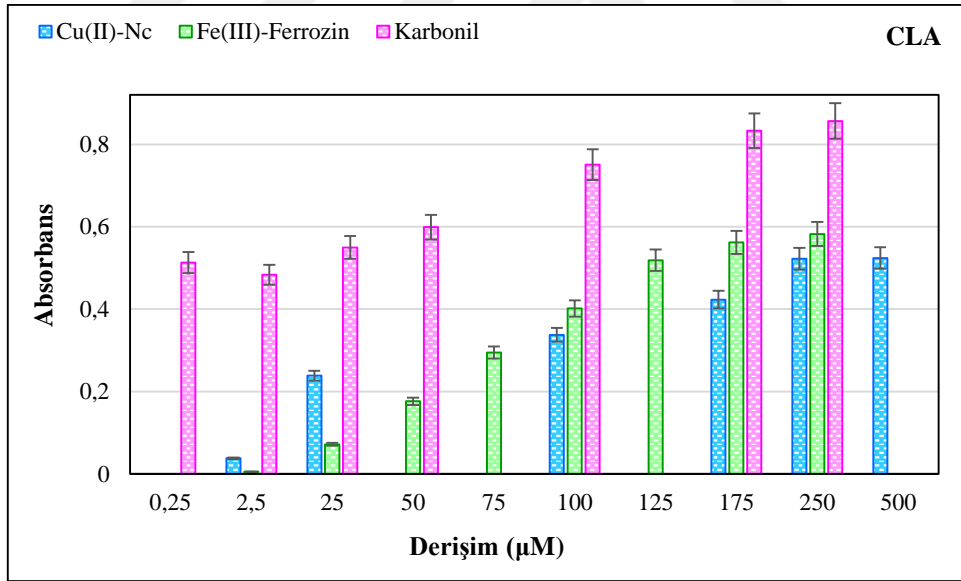
Şekil 4.3: ECAT için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.



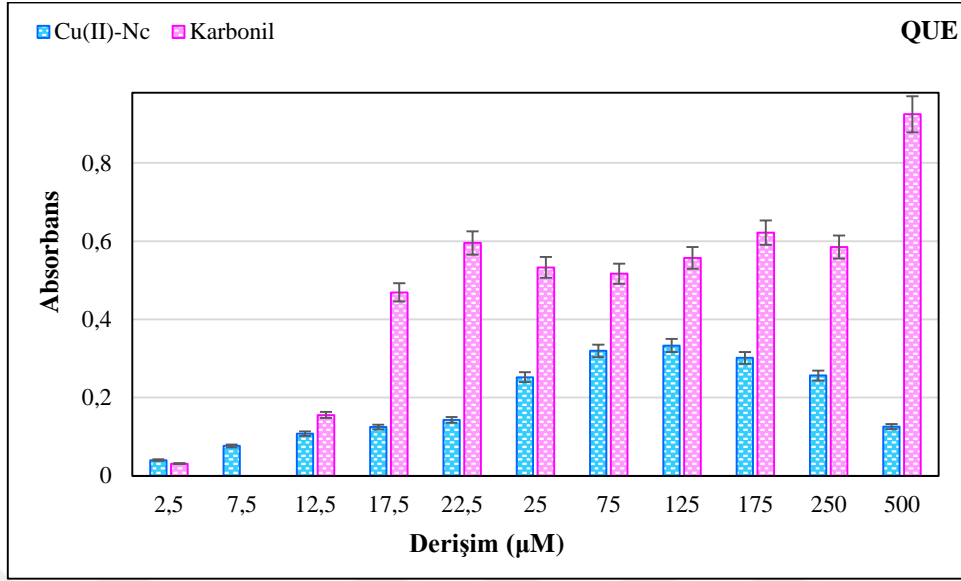
Şekil 4.4: CAT için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.



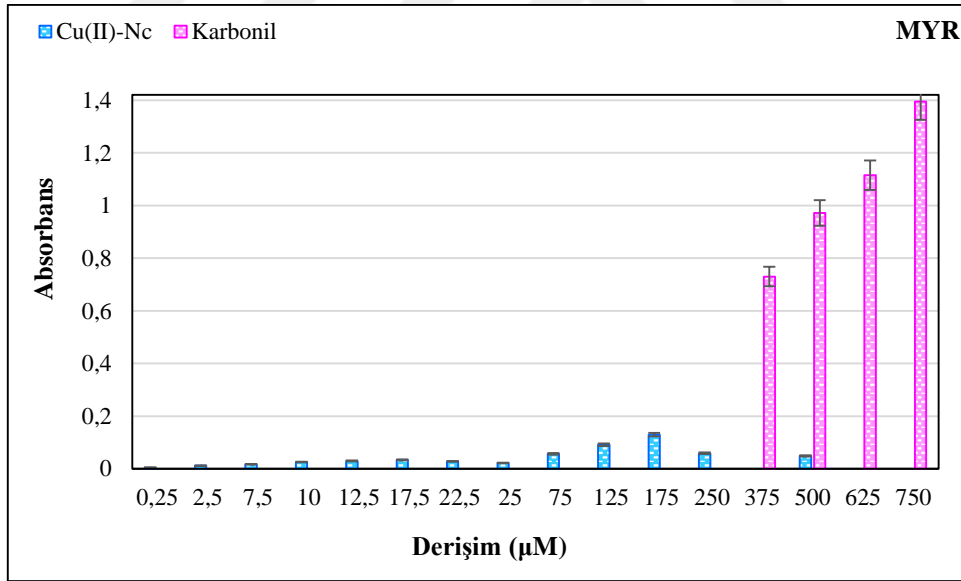
Şekil 4.5: GA için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.



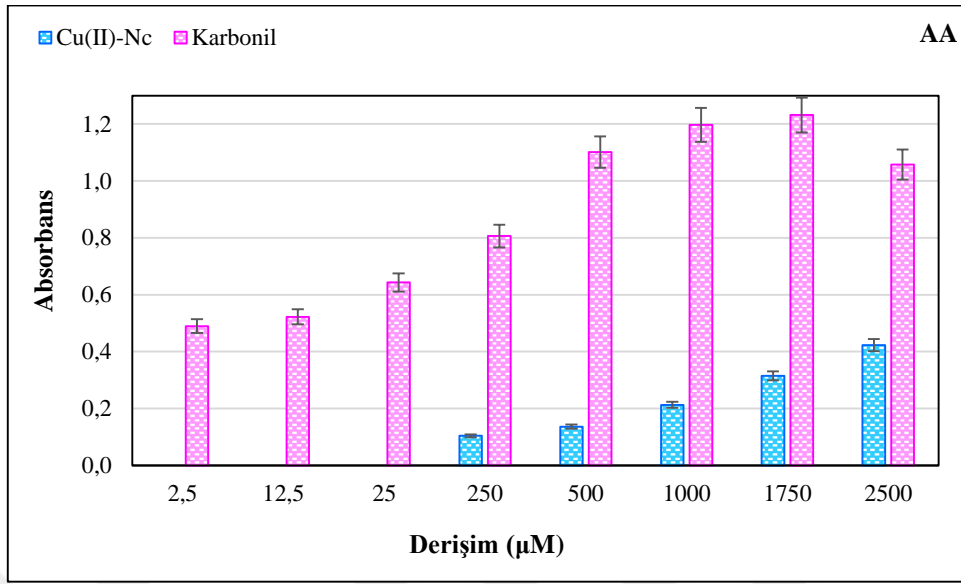
Şekil 4.6: CLA için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc, Fe(III)-Fz ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.



Şekil 4.7: QUE için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.



Şekil 4.8: MYR için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.



Şekil 4.9: AA için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile elde edilen derişim-absorbans grafiği.

Çalışılan bileşiklerin biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemine göre elde edilen molar absorplama katsayıları bakımından bileşiklerin sıralaması aşağıdaki gibidir:

QUE > ECAT > CAT > GA > CLA > MYR > AA, CLA > GA > ECAT > CAT

ve QUE > CLA > CAT > GA > ECAT > AA > MYR

Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemlerinde QUE en güçlü prooksidan iken MYR ve AA en zayıf olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). QUE, etkili antioksidan davranış için B halkasındaki *orto*-dihidroksi (kateşol) yapısı, 2nci ve 3ncü karbon atomları arasındaki çift bağ (C halkasında 4ncü karbon atomunda keto grubu oluşturarak ve radikal B halkasında elektron delokalizasyonunu arttıran), C ve A halkalarındaki 3ncü ve 5nci pozisyondaki hidroksil grupları (maksimum radikal süpürme potansiyeli için gerekli olan) gibi tüm gerekliliklere sahip olduğundan çeşitli antioksidan yöntemlerinde en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olması beklenmektedir. Diğer taraftan, Tablo 4.2’de görüldüğü üzere Cu(II)→Cu(I) redüksiyonunu takiben protein hasarı oluşturabilen reaktif türlerin üretilmesi esasına dayanan bir prooksidan aktivite testinde, QUE gibi güçlü bir antioksidanın en etkili prooksidan (Cao ve diğ., 1997; Kondakçı ve diğ., 2013) olduğu da görülmektedir.

Daha önceki çalışmamızda (Kondakçı ve diğ., 2013) olduğu gibi, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yönteminde de CAT ve ECAT benzer etkiler gösterirken, AA'in en düşük prooksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Bununla birlikte, bu çalışmada önceki bulgumuzun aksine, QUE'nin prooksidan aktivitesi, CAT ve ECAT'nin aktivitesinden çok daha yüksek bulundu. Bu bulgu, flavonollerin bakır katalizli prooksidan aktivitelerinin, aynı sayıda hidroksil grubuna sahip flavononlara kıyasla daha yüksek olabileceği iddiasıyla uyumludur (Cao ve diğ., 1997). Tablo 4.2'deki veriler göstermektedir ki, modifiye karbonil tayini yöntemi biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yönteminden daha yüksek kayım değerleri ve daha düşük korelasyon katsayılarına sahiptir. Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemine göre ise en güçlü prooksidan etki CLA için belirlendi. Bu yöntemle QUE, MYR ve AA bileşikleri için, yukarıda açıkladığımız olaylar (Khan ve Martell, 1967; Keypour ve diğ. 1986) nedeniyle anlamlı sonuçlar elde edilemediğinden diğer yöntemlerle karşılaştırma yapmamız mümkün olmadı. Daha az sayıda bileşiğe (CLA, GA, ECAT ve CAT) cevap veren bu yöntemin avantajı, kayım değerlerinin çok düşük olmasıdır.

Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi bulgularına göre ECAT, CAT, GA, CLA, QUE ve MYR, 2.5 μ M derişimin üzerinde prooksidan aktiviteye sahipken, AA 0.25 mM derişimin üzerinde prooksidan etki gösterdi. Fe(III)-Fz yöntemi ile ECAT, CAT, GA ve CLA bileşikleri için, Cu(II)-Nc yöntemine benzer şekilde, 2.5 μ M derişimin üzerinde prooksidan aktivite ölçüldü. Modifiye karbonil tayini yöntemi ile geniş bir derişim aralığında absorbans değerlerinin neredeyse sabit kaldığı ve sadece çok yüksek derişimlerde önemli bir artış olduğu gözlemlendi.

Literatürde, antioksidan bileşiklerin anti- ve prooksidan aktivite sergiledikleri çeşitli derişim değerleri bulunmaktadır. QUE bileşiğinin prooksidan aktivitesinin tayini için Cu(II)-katalizli LDL oksidasyonunun ölçülmesi esasına dayanan TBARS yöntemi kullanılmış ve 2 μ M derişimde antioksidan aktiviteye, 4.3 μ M derişimde prooksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Cirico ve Omaye, 2006). AA ve GA'in prooksidan aktivitesini belirlemek için Fe(III)-katalizli deoksiriboz oksidasyonunun ölçümü yapılan çalışmada bu bileşiklerin sırasıyla 0.82 mM ve 0.6 mM derişimlerde prooksidan etki gösterdiği ifade edilmiştir (Yen ve diğ., 2002). Yapılan başka bir çalışmada yağlarda meydana gelen konjuge dien hidroperoksit ölçümü esasına dayanan bir yöntemle CAT ve ECAT'ın 5 ve 20 μ M derişimlerde prooksidan etki gösterdiği ifade edilmiştir (Huang ve Frankel, 1997).

Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin istatistiksel karşılaştırılması için, ECAT standardı ve 5 kat

seyreltilmiş adaçayı ekstraktının toplam prooksidan aktiviteleri (TPA), her bir yöntem için belirlenen ECAT doğru denklemleri kullanılarak ECAT eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Tablo 4.3 ve 4.4'te verilen *F*-testi sonuçlarına göre biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ile modifiye karbonil tayini yöntemlerinin ve biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ile Fe(III)-Fz yöntemlerinin kesinlikleri arasında % 95 güvenilirlik aralığında, önemli bir farklılığın olmadığı görüldü.

Tablo 4.3: ECAT standardı ile 5 kat seyreltik adaçayı ekstraktının, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile belirlenmiş TPA (mg ECAT L⁻¹) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (% 95 güvenilirlik aralığında).

Örnek	Parametre	Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi	Modifiye karbonil tayini yöntemi
ECAT standartı	Örnek sayısı	5	5
	Ortalama	105.0	58.1
	Standart sapma	1.9	2.8
	Varyans	3.7	7.6
	Serbestlik derecesi		4
	$F_{hesaplanan}$		3.1
	F_{kritik}		6.4
Adaçayı ekstraktı	Örnek sayısı	5	5
	Ortalama	142.8	135.9
	Standart sapma	1.8	3.3
	Varyans	3.2	11.2
	Serbestlik derecesi		4
	$F_{hesaplanan}$		3.4
	F_{kritik}		6.4

Tablo 4.4: ECAT standardı ile 5 kat seyreltik adaçayı ekstraktının, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile belirlenmiş TPA (mg ECAT L⁻¹) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (% 95 güvenlilik aralığında).

Örnek	Parametre	Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi	Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemi
ECAT standardı	Örnek sayısı	5	5
	Ortalama	105.0	56.9
	Standart sapma	1.9	1.7
	Varyans	3.7	3.0
	Serbestlik derecesi		4
	$F_{hesaplanan}$		1.21
	F_{kritik}		6.4
Adaçayı ekstraktı	Örnek sayısı	5	5
	Ortalama	142.8	255.4
	Standart sapma	1.8	2.9
	Varyans	3.2	8.6
	Serbestlik derecesi		4
	$F_{hesaplanan}$		2.7
	F_{kritik}		6.4

4.4.SENTETİK KARIŞIMLARIN TOPLAM PROOKSİDAN AKTİVİTELERİ

Çalışılan bileşiklerin, derişimleri doğrusal çalışma aralıklarına uygun olacak şekilde seçilerek hazırlanmış ikili karışım çözeltilerinden 1'er mL alınarak biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri uygulandı ve karışımların TPA değerleri (deneysel ve teorik) mM ECAT eşdeğeri olarak hesaplanarak sonuçlar Tablo 4.5'te özetlendi. Sentetik karışım çözeltilerinin beklenen prooksidan aktiviteleri, kendi doğru denklemlerinden bulunan absorbans değerleri kullanılarak elde edilen mM ECAT eşdeğeri cinsinden derişimlerinin toplanması suretiyle hesaplandı. Belirlenen sonuçlara göre sentetik karışımların prooksidan aktiviteleri her iki yöntem için de çoğunlukla beklenenden düşük olmakla birlikte (toplamsal olmaması beklenen bir sonuçtur) geliştirilen Cu(II)-Nc yöntemi ile elde edilen deneysel ve teorik veriler birbiriyle daha uyumlu bulundu. AA'in prooksidan aktivite ölçümü Fe(III)-Fz yöntemi ile gerçekleştirilemediğinden sadece Karışım 1 (0.4 mM ECAT + 0.2 mM CLA)'e bu

yöntem uygulandı. Beklenen TPA (mM ECAT) değeri, 0.64 iken deneysel değer, 0.43 ± 0.02 olarak bulundu. Karışım 1'in biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemi ile belirlenen TPA değeri, Cu(II)-Nc yöntemindeki gibi beklenenden düşüktür.

Tablo 4.5: Çalışılan bileşiklerin ikili sentetik karışımlarının deneysel olarak bulunan ve teorik olarak beklenen mM ECAT eşdeğeri cinsinden TPA değerleri.

Örnek	Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi		Modifiye karbonil tayini yöntemi	
	Bulunan TPA ^a	Beklenen TPA	Bulunan TPA ^a	Beklenen TPA
Karışım 1	0.48 ± 0.01	0.55	2.39 ± 0.03	1.38
Karışım 2	0.17 ± 0.02	0.18	1.53 ± 0.03	4.17
Karışım 3	0.15 ± 0.02	0.21	1.27 ± 0.03	4.49

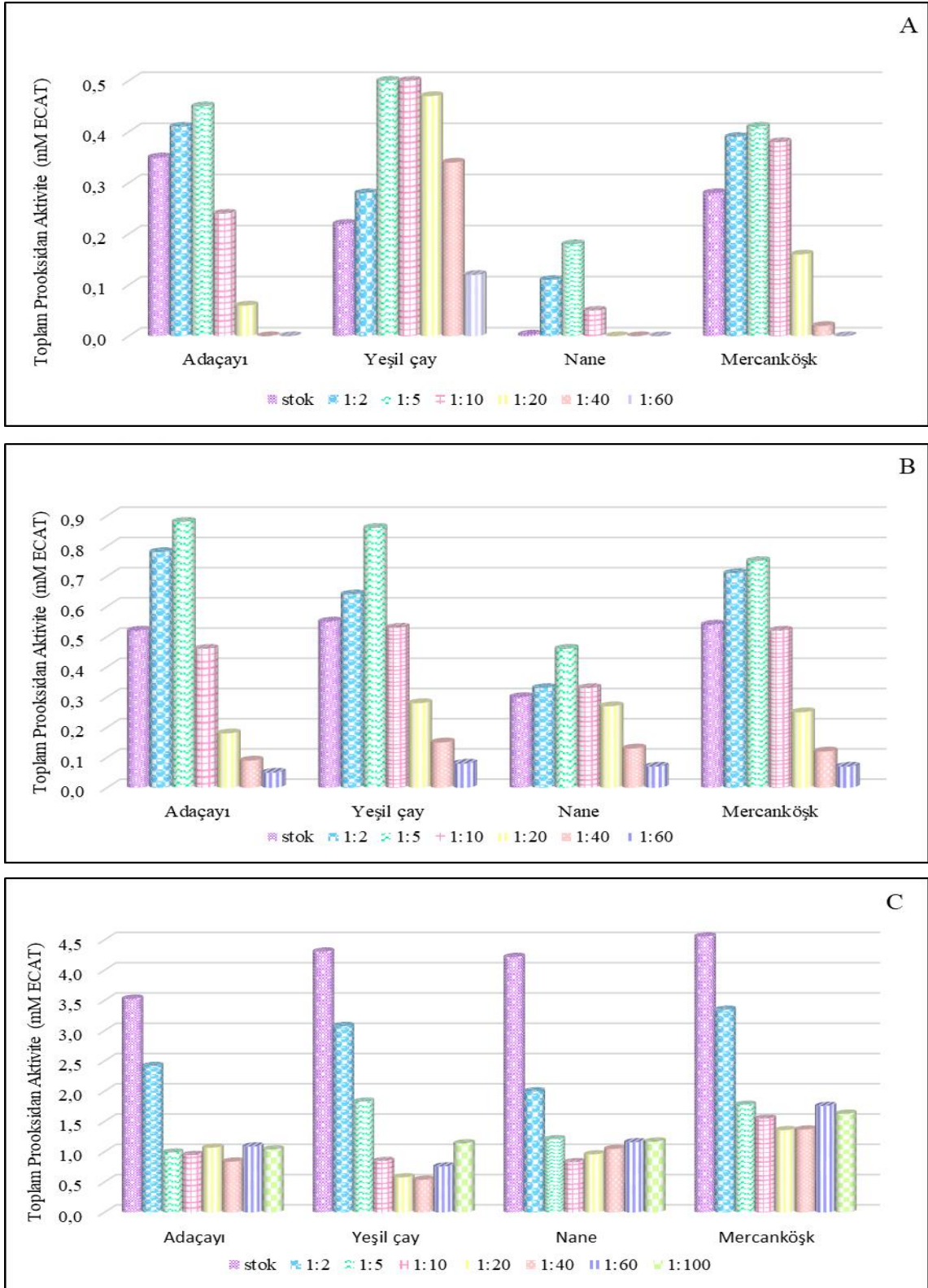
^a Ortalama değer \pm standart sapma (SD) (n=3).

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi karışımlarda genel olarak antagonistik etkiler baskındır. Tepkime ortamında oluşan Cu(I), protein tiyollerine yüksek bir kompleksleşme sabitiyle bağlandığı için, Cu(II,I) indirgeme potansiyeli termodinamik olarak fenolik bileşiklerin oksidasyonu için gerekli düzeye yükselmektedir (Cu(II) formuna nazaran Cu(I) formunun seçici stabilizasyonu nedeniyle). Antioksidanların Cu(II)'yi indirgemesi ve Cu(I)-protein bağlanmasından oluşan birleşik tepkime temelde bir elektron transferi (ET) tepkimesidir. Bu tepkimeler, kısmen yükseltgenmiş bir semikinon radikali ile yükseltgenmemiş bir fenolik (örneğin; Ar-O*... HO-Ar formunda) arasındaki hidrojen bağı oluşumu sırasında proteine bağlı Cu(I) etrafında yığılma meydana gelmesi ve test edilen antioksidan karışımın elektron transfer sürecini yavaşlatması gibi sebeplerle antagonistik olarak etkilenebilir. Bir diğer olasılık, Cu(II)'yi sadece redoks potansiyeli daha uygun olan antioksidanın indirgemesi ve diğerinin Cu(II,I) redüksiyon sürecine karışmamasıdır. Bu durumlar antioksidan karışımların antagonistik davranışlarını açıklayabilir. Benzer olaylar Fe(III) iyonları varlığında da mümkün olmakla birlikte, Fe(II) iyonlarının proteine bağlanması bakırdan farklı olarak oksijen ya da azot atomları üzerinden mümkün olabilmektedir (Ilari ve diğ., 2000). Ayrıca, ortamda oluşan Fe(II) iyonlarının bazı flavonoidlerle (QUE ve MYR gibi) kompleks oluşturduğu bilindiğinden proteine bağlanmadığı da düşünüldü (Verdan ve diğ., 2011; Mira ve diğ., 2002).

4.5.BAZI ŞİFALI BİTKİLERİN TOPLAM PROOKSİDAN AKTİVİTELERİ

Geliştirilen sensör kullanılarak gerçek örneklerin prooksidan aktivitelerinin belirlenmesinde adaçayı, yeşil çay, nane ve mercanköşk bitkilerinden hazırlanan ekstraktlar (infüzyon çözeltileri) kullanılmıştır. Literatürde, bahsedilen bitkisel infüzyonların önemli fenolik bileşenlerinin, adaçayında; vanilik asit, kafeik asit, rozmarinik asit, luteolin glikozidi, kuersetin ve kamferol (Kaliora ve diğ., 2014; Atoui ve diğ., 2005), nanede; kafeik asit, rozmarinik asit, eriyodiktol, luteolin ve apigenin glikozidi (Atoui ve diğ., 2005), yeşil çayda; kateşin, epikateşin, epigallokateşin-3-gallat, kuersetin glikozidi, kamferol ve mirisetin (Atoui ve diğ., 2005; Pękal ve diğ., 2012), mercanköşkte; protokateşuik asit, sirinjik asit, gallik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, sinapik asit, rozmarinik asit, kateşin, epikateşin, kamferol ve kuersetin (Kaliora ve diğ., 2014) olarak belirlendiği bildirilmektedir.

Yeşil çay, nane, ada çayı ve mercanköşk infüzyon çözeltileri bitki örneklerinin hazırlanması bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra 1:2-1:100 (v/v) aralığında farklı oranlarda seyreltilerek biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemi uygulanmıştır. Her üç yöntemin uygulanması sonucu belirlenen TPA değerleri mM ECAT eşdeğeri olarak Şekil 4.10 A, B ve C’de görülmektedir. Şekil 4.10 A’da görüldüğü üzere yüksek seyrelme oranlarında azalmakta olan TPA değerleri düşük seyrelme oranlarında artmaktadır. Bu eğilim, bitki ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin daha yüksek derişimlerde tekrar güçlenebileceği şeklinde açıklanabilir. Bu nedenle polifenolik bileşiklerin prooksidan aktiviteleri, incelenen bitkiye bağlı olarak kısıtlı bir derişim bölgesi ile sınırlandırılmalıdır. Fakat modifiye karbonil tayini sonuçları bu hipotezi desteklememiştir (Şekil 4.10 C). Çünkü bitki ekstraktlarının TPA değerleri artan seyreltme oranları ile azalma eğilimi sergilemiş ve pratik olarak bitki türüne bağlı olarak belirli bir oranın üzerinde değişiklik göstermemiştir. Bu durum Şekil 4.3-9’da gözlenen davranışlara oldukça benzer olup, polifenolik bileşiklerin ve/veya onları içeren bitki ekstraktlarının geniş derişim aralığında prooksidan aktivite ölçümü için modifiye karbonil tayini yönteminin çok uygun olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.10: Farklı oranlarda seyreltilen bitki ekstraktlarının, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc (A) ve Fe(III)-Fz (B) yöntemleri ile modifiye karbonil tayini (C) yöntemine göre hesaplanmış TPA (mM ECAT) değerleri.

Şekil 4.10'daki verilere dayanarak; bahsedilen bitkisel ekstraktların biyosensör esaslı Cu(II)-Nc (A) ve Fe(III)-Fz (B) ile modifiye karbonil tayini (C) yöntemleri için hesaplanan TPA değerleri sırasıyla; yeşil çay için 13.80, 6.0, 9.15; adaçayı için 2.42, 4.60, 4.84; mercanköşk için 3.20, 5.00, 6.70 ve nane için 0.45, 3.30, 4.00 mM ECAT olarak belirlendi. Çalışılan bitki örneklerinin TPA değerleri, her üç yöntemle de doğrusal olarak değişim gösterdiği bölgeden seçilen seyrelme oranı dikkate alınarak mM ECAT eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Her üç yöntemle belirlenen değerlerin birbirinden farklı bulunması, yöntemlerin farklı mekanizmalarının olması (özellikle karbonil tayini yönteminde) ve cevap verdikleri bileşiklerin farklı olması ile açıklanabilir. A ve B grafiklerini (Şekil 4.10) karşılaştırdığımızda Fe(III)-Fz yönteminin duyarlılığının daha yüksek olduğu görülmektedir ve bunun sonucu olarak bu yöntemle belirlenen TPA değerleri, Cu(II)-Nc yöntemine göre daha yüksek bulundu (yeşil çay hariç). Bu sonuçlar, yöntemde ECAT için belirlenen doğru denkleminde, kayım değerinin çok küçük olması ile de ilişkilendirilebilir. Fakat bu yöntem, QUE, MYR ve AA bileşiklerinin prooksidan aktivitesini ölçmek için kullanılmadığından, bitki ekstraktlarının, dolayısıyla içerdikleri antioksidan bileşiklerin, TPA değerlerinin belirlenmesinde Cu(II)-Nc yönteminin daha uygun olacağı sonucuna varıldı.

Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin geri kazanım değerlendirmesi, seyreltilmiş bitki ekstraktlarına ECAT bileşiğinin iki derişimde (0.10 ve 0.20 mM) katkısının yapılması suretiyle gerçekleştirildi (Tablo 4.6 ve 4.7). İstatistiksel veriler (eklenen, beklenen ve bulunan değerler) mM ECAT eşdeğeri cinsinden Tablo 4.6 ve 4.7'de verildi. Elde edilen geri kazanım değerlerinin (seyreltme oranları dikkate alınarak) % 100'e yakın bulunması, polifenolik bileşikleri içeren bitki örneklerinin TPA değerlerini belirlemek için biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin uygun olduğunu göstermekle birlikte Fe(III)-Fz yönteminin önemli antioksidan bileşiklere (QUE, MYR ve AA) yanıt vermediği hatırlandığında Cu(II)-Nc yönteminin bitkisel kaynaklı gıdalarda prooksidan aktivite ölçümü için daha uygun olduğu söylenebilir.

Tablo 4.6: Farklı seyreltiklikteki bitki ekstraktlarına ECAT katkısı yapılması sonucunda, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi ile belirlenmiş % geri kazanım (mM ECAT eşdeğeri) değerleri.

Bitki ekstraktı	Eklenen (mM)	Beklenen (mM)	Bulunan (mM) ^a	Geri kazanım (%)	%RSD
1:10 seyreltik adaçayı	-	-	0.16±0.01	-	2
	0.10	0.26	0.27±0.01	104	2
	0.20	0.36	0.40±0.01	111	2
1:20 seyreltik yeşil çay	-	-	0.44±0.01	-	1
	0.10	0.54	0.52±0.02	96	3
	0.20	0.64	0.61±0.01	95	2
1:10 seyreltik nane	-	-	0.24±0.01	-	2
	0.10	0.34	0.34±0.01	100	2
	0.20	0.44	0.46±0.01	104	2
1:20 seyreltik mercanköşk	-	-	0.53±0.01	-	1
	0.10	0.63	0.65±0.02	103	2
	0.20	0.73	0.75±0.02	103	2

^a Ortalama değer ± Standart sapma (SD) (n=3).

Tablo 4.7: Farklı seyreltiklikteki bitki ekstraktlarına ECAT katkısı yapılması sonucunda, biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yöntemine ile belirlenmiş % geri kazanım (mM ECAT eşdeğeri) değerleri.

Bitki Ekstraktı	Eklenen (mM)	Beklenen (mM)	Bulunan (mM) ^a	Geri kazanım (%)	R.S.D. (%)
1:10 seyreltik adaçayı	-	-	0.46±0.01	-	2
	0.10	0.56	0.57±0.01	102	2
	0.20	0.66	0.65±0.01	98	2
1:10 seyreltik yeşil çay	-	-	0.53±0.01	-	2
	0.10	0.63	0.62±0.01	98	2
	0.20	0.73	0.72±0.01	99	1
1:10 seyreltik nane	-	-	0.34±0.01	-	3
	0.10	0.44	0.45±0.01	102	2
	0.20	0.54	0.53±0.01	98	2
1:10 seyreltik mercanköşk	-	-	0.52±0.01	-	2
	0.10	0.62	0.61±0.01	98	2
	0.20	0.72	0.71±0.01	99	1

^aOrtalama değer ± Standart sapma (SD) (n=3)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyolojik sistemlerdeki metabolik tepkimeler sırasında, ROS, RNS, RSS gibi ürünler oluşabilmekte ve lipit, protein, DNA gibi büyük moleküllü hücre bileşenlerine zarar vermektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (Halliwell, 2008). Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif gerilim olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Oksidatif gerilim, organizmadaki prooksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Prooksidanlar, biyolojik makromoleküllerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ya da hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Modern tıp bir yandan hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler araştırırken bir yandan da sağlıklı bir yaşam sürdürme ve hastalıkları önleme alanında yoğun çalışmalar yapmaktadır. Bu bağlamda, serbest radikal oluşumunun ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi söz konusu hastalıklara yakalanma riskini azaltmak üzere antioksidan diyet uygulanması ve/veya ilaç kullanımı açısından önemli olmaktadır. Dolayısıyla, biyoaktif maddelerin yapılarına ve buldukları koşullara göre antioksidan/prooksidan davranışlarının anlaşılması son derece önemlidir (Laguette ve diğ., 2007).

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıllarda, baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunurlar. Fenolik bileşikler ile C vitamini meyve ve sebzelerde bol bulunan doğal antioksidanlardır. Antioksidan özelliğe sahip bileşikler sağlığa yararlı etkiler göstermelerine karşın bazı koşullar (geçiş metali iyonları ve bunların derişimi, O₂ vb.) altında prooksidan davranış gösterebilmektedirler (Rietjens ve diğ., 2002). Yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin geçiş metal iyonu varlığında prooksidan etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Childs ve diğ., 2001; Hanif ve diğ., 2008).

Daha önceki bir çalışmamızda (Kondakçı ve diğ., 2013), içerdiği proteinlerde tiyol (-SH) grubu bulunan yumurta akı çözeltisi kullanılarak, çeşitli polifenolik bileşiklerin, C ve E vitaminlerinin ve bazı şifalı bitki ekstraktlarının Cu(II) katalizli prooksidan aktivitelerini ölçmek amacıyla spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, antioksidanlarla Cu(I)'e indirgenen ve proteine bağlanan Cu(I)'in neokuproin (Nc) ayırıcı ile oluşturduğu kelatin 450 nm'deki absorpsiyonunun ölçümüne dayanmaktaydı. Bu tez çalışmasında ise özellikle bitkisel örneklerde

bol miktarda bulunan ve bugüne kadar antioksidan özelliğiyle öne çıkan fenolik bileşiklerin metal katalizli {Cu(II) ve Fe(III)} prooksidan aktivitelerinin ölçümü için protein yapısında katı bir prooksidan sensörü hazırladık ve basit kolorimetrik yöntemler geliştirdik. Bir önceki çalışmadan farklı olarak, yumurta akı çözeltisi yerine yumurta akından hazırladığımız, dayanıklı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren protein yapısında katı bir biyosensör kullandık. Sensörün hazırlanmasında, çeşitli protein çöktürme yöntemlerini denedik ve CaCl₂ ile çöktürmenin kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi nedeniyle uygun olduğunu gördük. Polifenoller ve bitki örneklerinin Cu(II)- ve Fe(III)-katalizli prooksidan aktivitelerini hazırladığımız katı biyosensörü kullanarak, bakır için Nc, demir için Fz ayıraçları yardımıyla ölçtük. Prooksidan aktivitesi incelenecek bileşikler; GA (hidroksibenzoik asit), CLA (hidroksisinnamik asit), CAT, ECAT (flavanol), QUE, MYR (flavonol), AA (fenolik olmayan antioksidan) gibi farklı antioksidan ve polifenol sınıflarını temsil edecek şekilde seçtik.

Geliştirilen yöntemlerin esası, antioksidan bileşiklerin Cu(II) iyonlarını Cu(I)'e, Fe(III) iyonlarını Fe(II)'ye indirgemesi (eş zamanlı ROS açığa çıkması) ve oluşan Cu(I) veya Fe(II)'nin katı biyosensöre bağlanmasına dayanmaktadır. Antioksidanların prooksidan davranışlarının bir göstergesi olan proteine bağlı-Cu(I), 450 nm'de neokuproin (Nc); proteine bağlı-Fe(II) ise 562 nm'de ferrozin (Fz) ayıraçları kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Prooksidan aktivitesi incelenen bileşiklerin ikili sentetik karışımlarının ve bitki örneklerinin (adaçayı, yeşil çay, nane ve mercanköşk) ekstraktlarının TPA değerleri mM ECAT eşdeğeri cinsinden hesaplandı.

Proteinler, oksidatif hasarın başlıca hedefleri olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif gerilimin proteinlerde neden olduğu oksidasyon sonrası peroksitler ve protein karbonilleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun ürünü olan karbonil grupları Alzheimer hastalığı, diyabet, inflamatuvar kemik hastalığı, artrit gibi bazı hastalıklarda bir belirteç olarak görülmektedir (Chevion ve diğ., 2000). Bu nedenle, hazırlamış olduğumuz protein yapısındaki biyosensörde, prooksidan etki sonucu açığa çıkabilecek karbonil gruplarını belirlemek amacıyla modifiye karbonil tayini yöntemini kullandık ve yine mM ECAT eşdeğeri olarak TPA değerlerini hesapladık.

Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemi bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi, LOD ve LOQ değerleri, gün içi-günler arası tekrarlanabilirlik ve *F*-testi gibi analitik performans verilerine göre yapıldı. Elde edilen sonuçlar, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin TPA ölçümü için

kullanılabileceğini gösterdi. Bu yöntemlerin en önemli avantajları, düşük maliyetli, katı biyosensörün kullanımına uygun olmaları ve fazla miktarlarda hazırlanabilen biyosensörün uzun süre kullanılabilmesidir.

Geliştirilen biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yönteminin birinci ve ikinci inkübasyon aşamalarının optimum süreleri, ECAT (0.25 mM), AA (2.5 mM) ve QUE (0.025 mM) bileşikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemin uygulandığı 3 antioksidan bileşiği için de ortak olarak, 1nci inkübasyon süresi 30 dk, 2nci inkübasyon süresi 20 dk olarak belirlendi (Şekil 4.1. A).

Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yönteminin birinci ve ikinci inkübasyon aşamalarının optimum inkübasyon süreleri, ECAT (0.25 mM) ve GA (0.25 mM) bileşikleri kullanılarak belirlendi. QUE yönteme cevap vermediği için kullanılmadı. Elde edilen sonuçlara göre her iki inkübasyon için de optimum süre, 30 dk olarak belirlendi (Şekil 4.1. B).

Farklı antioksidan ve polifenol sınıflarını temsil edecek şekilde seçilen fenolik bileşiklerin hangi derişimlerde prooksidan aktivite gösterdiğini belirlemek için 0.25 ile 2500 μ M arasında geniş bir derişim aralığında çalışıldı. Cu(II) ve Fe(III) katalizli prooksidan aktivite ölçümü sonucu elde edilen verilere göre 2.50 μ M derişimin üzerinde bu etkinin daha belirgin olduğu görüldü. Çalışılan bileşiklerin, biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemine göre elde edilen molar absorplama katsayılarının sıralaması aşağıda verildiği gibidir:

QUE > ECAT > CAT > GA > CLA > MYR > AA, CLA > GA > ECAT > CAT

ve QUE > CLA > CAT > GA > ECAT > AA > MYR

Geliştirilen biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yönteminin esası; polifenolik bileşikler tarafından ortamdaki serbest bakır(II) iyonlarının bakır(I)'e indirgenerek proteine bağlanması ve inkübasyon ürününe neokuproin (Nc)-amonyum asetat (NH₄Ac) karışımı ilave edilerek Cu(I)-Nc kelatının oluşturulmasına dayanmaktadır. Oluşan Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de absorpsiyonu ölçülerek polifenolik bileşiklerin prooksidan aktiviteleri tayin edildi. Prensipte, çalışılan bileşikler, Cu(II) iyonlarını Cu(I)'e indirger ve açığa çıkan Cu(I) bir yandan Fenton-tipi tepkimelere neden olurken diğer yandan kısmen hasar görmüş proteinlerin -SH gruplarına kuvvetli kovalent bağlarla bağlanır. Aynı zamanda ortamda oluşan serbest radikaller protein gibi biyolojik makromoleküllere saldırarak, oksidatif hasara sebep olurlar. Yani protein hasarı

hem çözeltilerde oluşan hem de proteine bağlanan (mevkiye özgü) Cu(I)'in ROS üretiminden kaynaklanır. Bunun sonucunda, polifenolik bileşik miktarının artışıyla radikal oluşumu artacağından, prooksidan aktivite miktarında artış gözlenmesi beklenir (Kondakçı, E., 2011). Elde edilen sonuçlar da bu açıklamayı destekler niteliktedir.

Biyosensör esaslı Fe(III)-Fz yönteminin esası ise fenolik bileşikler tarafından ortamdaki serbest Fe(III) iyonlarının demir(II)'ye indirgenmesi ve oluşan Fe(II) iyonlarının proteine bağlanması sonucunda, ferrozin ayırıcı ve asetat tamponu (CH₃COOH/CH₃COONa) ilave edilerek Fe(II)-Fz kelatının oluşturulmasına dayanmaktadır. Oluşan Fe(II)-Fz kelatının 562 nm'de absorpsiyonu ölçülerek çalışılan bileşiklerin prooksidan aktiviteleri tayin edildi. Yapılan bir çalışmada, flavonoidlerin metal kelatlama özellikleri incelenmiş ve bu bileşiklerin bakır tuzlarını indirgeme gücünün demirinkinden daha güçlü olduğu ifade edilmiştir (Mira ve diğ., 2002). Ölçümlerin elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi (ESI-MS) ile gerçekleştirildiği çalışmada, demir ve çeşitli flavonoidlerin pH ≤ 5.5 civarında, 1:1 ve 1:2 oranlarında (metal/flavonoid) kompleks yapılar oluşturduğu tespit edilmiş ve özellikle QUE ile MYR bileşiklerinin oluşturduğu kararlı komplekslerin 4-okso ve 3- ya da 5-hidroksil grupları arasında olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise (Verdan ve diğ., 2011), flavonoidlerin Fenton reaksiyonunu ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$) engelleyerek demir iyonları kaynaklı DNA hasarını önlediği belirtilmiştir. Bu çalışmada, flavonoidlerden olan QUE ve MYR bileşiklerinin demir iyonlarıyla pH 6'da oluşturdukları kompleksler incelenmiş ve bu bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin metal iyonlarını bağlamalarından ileri geldiği ifade edilmiştir. QUE ve MYR'in Fe(III) iyonları ile 3-hidroksi-4-keto veya 5-hidroksi-4-keto üzerinden bağlanabildiğinin belirtildiği çalışmada değerlendirmeler, UV-görünür bölge spektrometrisi ile yapılmıştır. Bütün bu değerlendirmeler, çalışmamızda gözlemlediğimiz QUE ve MYR için Fe(III)-katalizli prooksidan aktivite ölçümü gerçekleştirilememesini açıklamaktadır. AA'in Fe(III) ile kompleks oluşturabildiği bilgisi de literatürde yer almaktadır (Khan ve Martell, 1967; Keypour ve diğ. 1986).

Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi bulgularına göre ECAT, CAT, GA, CLA, QUE ve MYR, 2.5 µM derişimin üzerinde prooksidan aktiviteye sahipken, AA 0.25 mM derişimin üzerinde prooksidan etki gösterdi. Fe(III)-Fz yöntemi ile ECAT, CAT, GA ve CLA bileşikleri için, Cu(II)-Nc yöntemine benzer şekilde, 2.5 µM derişimin üzerinde prooksidan aktivite ölçüldü.

Modifiye karbonil tayini yöntemi ile geniş bir derişim aralığında absorbans değerlerinin neredeyse sabit kaldığı ve sadece çok yüksek derişimlerde önemli bir artış olduğu gözlemlendi.

Literatürde, antioksidan bileşiklerin anti- ve prooksidan aktivite sergiledikleri çeşitli derişim değerleri bulunmaktadır. QUE bileşiğinin prooksidan aktivitesinin tayini için Cu(II)-katalizli LDL oksidasyonunun ölçülmesi esasına dayanan TBARS yöntemi kullanılmış ve 2 µM derişimde antioksidan aktiviteye, 4.3 µM derişimde prooksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Cirico ve Omaye, 2006). AA ve GA'in prooksidan aktivitesini belirlemek için Fe(III)-katalizli deoksiriboz oksidasyonunun ölçümü yapılan çalışmada bu bileşiklerin sırasıyla 0.82 mM ve 0.6 mM derişimlerde prooksidan etki gösterdiği ifade edilmiştir (Yen ve diğ., 2002). Yapılan başka bir çalışmada yağlarda meydana gelen konjuge dien hidroperoksit ölçümü esasına dayanan bir yöntemle CAT ve ECAT'ın 5 ve 20 µM derişimlerde prooksidan etki gösterdiği ifade edilmiştir (Huang ve Frankel, 1997).

Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri ile biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin istatistiksel karşılaştırılması için, ECAT standardı ve 5 kat seyreltilmiş adaçayı ekstraktının toplam prooksidan aktiviteleri (TPA), her bir yöntem için belirlenen ECAT doğru denklemleri kullanılarak ECAT eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Tablo 4.3 ve 4.4'te verilen *F*-testi sonuçlarına göre biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ile modifiye karbonil tayini yöntemlerinin ve biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ile Fe(III)-Fz yöntemlerinin kesinlikleri arasında % 95 güvenilirlik aralığında, önemli bir farklılığın olmadığı görülmektedir.

Çalışılan bileşiklerin ikili sentetik karışımlarına biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemlerinin uygulanması sonucunda belirlenen TPA (mM ECAT ekivalenti) değerleri, her iki yöntem için de beklenenden düşük olmakla birlikte önerilen yöntem ile elde edilen verilerin daha yakın olduğu görüldü. Bu durum, prooksidan aktivite değerlerinin toplamsal olmadığı sonucunu ortaya koymaktadır ki bu durum literatürde de belirtilmiştir. Bir çalışmada (Cirico ve Omaye, 2006), tek başına prooksidan aktivite gösteren bileşiklerin birarada bulduklarında, derişimlerine ve yapılarına da bağlı olarak, antioksidan etki gösterebildikleri belirtilmiştir. AA'in prooksidan aktivite ölçümü Fe(III)-Fz yöntemi ile gerçekleştirilemediğinden sadece Karışım 1 (0.4 mM ECAT + 0.2 mM CLA)'e yöntem uygulandı. Beklenen TPA (mM ECAT) değeri, 0.64 iken deneysel değer, 0.43±0.02 olarak bulundu.

Adaçayı, yeşil çay, nane ve mercanköşk bitkilerinin toplam prooksidan aktivitelerinin tayini için farklı oranlarda seyreltilmiş ekstraktlarına biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemleri ile modifiye karbonil tayini yöntemi uygulandı. Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin sonuçları, TPA'nın yüksek seyrelme oranlarında azaldığını, düşük seyrelme oranlarında arttığını gösterdi. Bitkisel ekstraktlara biyosensör esaslı Cu(II)-Nc (A) ve Fe(III)-Fz (B) ile modifiye karbonil tayini (C) yöntemlerinin uygulanması sonucunda TPA değerleri sırasıyla; yeşil çay için 13.80, 6.0, 9.15; adaçayı için 2.42, 4.60, 4.84; mercanköşk için 3.20, 5.00, 6.70 ve nane için 0.45, 3.30, 4.00 mM ECAT olarak belirlendi (Şekil 4.10). Çalışılan bitki ekstraktlarının TPA değerleri, her üç yöntemle de, doğrusal olarak değişim gösterdiği bölgeden seçilen seyrelme oranı dikkate alınarak, mM ECAT eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Her üç yöntemle belirlenen değerlerin birbirinden farklı bulunması, yöntemlerin farklı mekanizmalarının olması (özellikle karbonil tayini yönteminde) ve cevap verdikleri bileşiklerin farklı olması ile açıklanabilir. A ve B grafiklerini (Şekil 4.10) karşılaştırdığımızda Fe(III)-Fz yönteminin duyarlılığının daha yüksek olduğu görülmektedir ve bunun sonucu olarak bu yöntemle belirlenen TPA değerleri, Cu(II)-Nc yöntemine göre daha yüksek bulunmuştur (yeşil çay hariç). Bu sonuçlar, yöntemde ECAT için belirlenen doğru denklemde, kayım değerinin çok küçük olması ile de ilişkilendirilebilir. Fakat bu yöntem, QUE, MYR ve QUE bileşiklerinin prooksidan aktivitesini ölçmek için kullanılmadığından, bitki ekstraktlarının, dolayısıyla içerdikleri antioksidan bileşiklerin, TPA değerlerinin belirlenmesinde Cu(II)-Nc yönteminin daha uygun olacağı sonucuna varıldı.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğu gerçek örneklerle 2 farklı derişimde standart katkısı (0.1 ve 0.2 mM ECAT) yapılması suretiyle değerlendirildi. Elde edilen geri kazanım değerleri (seyrelme oranları dikkate alınarak) %100'e yakın bulundu. Bu durum, fenolik bileşikleri içeren bitki örneklerinin TPA değerlerini belirlemek için önerilen Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin kullanılabilceğini göstermektedir. Biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve modifiye karbonil tayini yöntemleri (Tablo 4.5) ve biyosensör esaslı Cu(II)-Nc ve Fe(III)-Fz yöntemlerinin (Tablo 4.6) F-testi sonuçlarına göre yöntemlerin kesinlikleri arasında, %95 güvenilirlik aralığında, önemli bir farklılık olmadığı belirlendi. Fakat Fe(III)-Fz yönteminin özellikle bitkilerin önemli antioksidan bileşiklerinden olan QUE ve MYR gibi bileşiklere yanıt vermediği unutulmamalıdır.

Gerçekte polifenollerin anti- veya prooksidan davranışlarının net bir değerlendirmesini yapabilmek oldukça güçtür. Çünkü in vitro ve in vivo sistemlerde polifenollerin anti- veya prooksidan etkileri polifenolik bileşiklerin derişimleri, yapıları ve ortam koşulları (geçiş metali iyonları ve bunların derişimi, O₂ vb.) gibi birçok faktöre bağlıdır. Polifenollerin antioksidan aktivitesi pek çok reaktif türe karşı gözlenebildiği halde prooksidan aktivite, seçilen tepkime tipine ve ortamına fazlasıyla bağımlıdır. Maurya ve Devasagayam (2010), ferulik ve kafeik asitin 5 µM derişimin üzerinde prooksidan aktivite gösterdiğini belirlemişler ve bu bileşiklerin prooksidan aktivitelerini demir(III)'ü indirgeme güçleri ile açıklamışlardır. Ayrıca, kafeik asitin ferulik asite göre daha yüksek indirgeme gücüne, yani prooksidan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada gallik asit ve epigallokateşin gallat gibi güçlü antioksidanların, deoksiriboz oksidasyonuna dayalı yöntemde, Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirgeme güçleri dolayısıyla kuvvetli prooksidan etki gösterdikleri de ifade edilmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular göstermektedir ki, yumurta akı proteinleri kullanılarak hazırlanan katı malzemenin kullanıldığı biyosensör esaslı Cu(II)-Nc yöntemi bitkisel kaynaklı antioksidanların prooksidan aktivite ölçümü için önerilebilecek bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

- Abeyrathne, E.D., Lee, H.Y., Ahn, D.U., 2013, Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--a review, *Poultry Science*, 92(12), 3292-3299.
- Ahsan, H., Parveen, N., Khan, N.U., Hadi, S.M., 1999, Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Chemico-biological interactions*, 121, 161-175.
- Anbudhasan, P., Surendraraj, A., Karkuzhali, S., Sathishkumaran, S., 2014, Natural antioxidants and its benefits, *International journal of food and nutritional sciences*, 3(6), 225-232.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 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, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 7970-7981.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P., 2005, Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, *Food chemistry*, 89, 27-36.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Demirata, B., Apak, R., 2010, A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent, *Analytical methods*, 2, 1770-1778.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *The journal of biological chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- Biddlecombe, R.A., Pleasance, S., 1999, Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format, *Journal of chromatography B*, 734, 257-265.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Methods in enzymology*, 52, 302-310.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000, Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species, *International microbiology*, 3, 3-8.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free radical biology & medicine*, 22(5), 749-760.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Chedea, V.S., Braicu, C., Socaciu, C., 2010, Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract, *Food chemistry*, 121, 132-139.

- Chevion, M., Berenshtein, E., Stadtman, E.R., 2000, Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage, *Free Radical Research*, 33, 99-108.
- Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell B., Leeuwenburgh C., 2001, Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise, *Free radical biology & medicine*, 31(6), 745–753.
- Cirico, L.T., Omaye, S.T., 2006, Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation, *Food and chemical toxicology*, 44, 510–516.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38.
- Dhara S., 2005, Synthesis of nanocrystalline alumina using egg white, *Journal of the american ceramic society*, 88(7), 2003-2004.
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M., 2016, Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals, *Phytotherapy research*, 30, 1379-1391.
- Exley, C., 2004, The pro-oxidant activity of aluminum, *Free radical biology & medicine*, 36(3), 380-387.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G., 2000, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 3597-3604.
- Galati, G., O'Brien, P.J., 2004, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free radical biology and medicine*, 37(3), 287-303.
- Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pomblum, V.J., Garcia, S.C., 2007, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43, 619–624.
- Gunther, M.R., Hanna, P.M., Mason, R.P., Cohen, M.S., 1995, Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: A spin-trapping study. *Archives of biochemistry and biophysics*, 316, 515-522.
- Hagerman, A.E., Dean, R.T., Davies, M.J., 2003, Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage, *Archives of biochemistry and biophysics*, 414, 115–120.
- Hajji, H., Nkhili, E., Tomao, V., Dangles, O., 2006, Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation, *Free radical research*, 40(3), 303-320.
- Halliwell, B., 2008, Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?, *Archives of biochemistry and biophysics*, 476, 107–112.

- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O.I., 1995, The characterization of antioxidants, *Food and chemical toxicology*, 33, 601-617.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1981, Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts, *Febs letters*, 128(2), 347-352.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O.I., 1987, The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, *Analytical biochemistry*, 165(1), 215-219.
- Hanif, S., Shamim, U., Ulah, M.F., Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hadia, S.M., 2008, The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA, *Toxicology*, 249, 19–25.
- Hawkins, C.L., Morgan, P.E., Davies, M.J., 2009, Quantification of protein modification by oxidants, *Free radical biology & medicine*, 46, 965-988.
- Headlam, H.A., Davies, M.J., 2004, Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products, *Free radical biology & medicine*, 36(9), 1175-1184.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572–584.
- Huang, S.W., Frankel, E.N., 1997, Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems, *Journal of agricultural and food chemistry*, 45, 3033-3038.
- Hudson, B.J.F., 1990, Food Antioxidants, Elsevier Science, USA.
- Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone E., Tsernoglou, D., 2000, The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site, *Nature structural biology*, 7(1), 38-43.
- Ishii, T., Mori, T., Ichikawa, T., Kaku, M., Kusaka, K., Uekusa, Y., Akagawa, M., Aihara, Y., Furuta, T., Wakimoto, T., Kan, T., Nakayama, T., 2010, Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18, 4892–4896.
- Jiang, L., He, L., Fountoulakis, M., 2004, Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, *Journal of chromatography A*, 1023, 317-320.
- Kaliora, A.C., Kogiannou, D.A.A., Kefalas, P., Papassideri, I.S., Kalogeropoulos, N., 2014, Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention?, *Food chemistry*, 142, 233-241.
- Kessler, M., Ubeaud G., Jung, L., 2003, Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55(1), 131-42.

- Keypour, H., Silver, J., Wilson, M.T., Hamed, M.Y., 1986, Studies on the reactions of ferric iron with ascorbic acid. A study of solution chemistry using mössbauer spectroscopy and stopped-flow techniques, *Inorganica chimica acta*, 125, 97-106.
- Khan M.M.T., Martell, A.E., 1967, Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation, *Journal of the american chemical society*, 89(16), 4176-4185.
- Kondakçı, E., 2011, *Polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktivitelerinin ölçümü için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kondakçı, E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2013, Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified Cu(II)-Nc assay method, *Talanta*, 115, 583-589.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Progress in lipid research*, 46, 244–282.
- Letelier, M.E., Sánchez-Jofré S., Peredo-Silva L., Cortés-Troncoso J., Aracena-Parks, P., 2010, Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects, *Chemico-biological interactions*, 188, 220-227.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in enzymology*, 233, 346-357.
- Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2010, Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems, *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.
- Lynch, S.M., Frei, B., 1995, Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein (LDL), *The journal of biological chemistry*, 270(10), 5158-5163.
- Magnani, L., Gaydou, E.M., Hubaud, J.C., 2000, Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion, *Analytica chimica acta*, 411, 209-216.
- Makris, D.P., Rossiter, J.T., 2002, Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: A preliminary investigation, *Journal of food composition and analysis*, 15, 103-113.
- Maurya, D.K., Devasagayam, T.P.A., 2010, Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3369-3373.
- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florêncio, M.H., Jennings, K.R., 2002, Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity, *Free Radical Research*, 36(11), 1199-1208.

- Moran, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., Abian, J., Becana, M., 1997, Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties, *Free radical biology & medicine*, 22(5), 861-870.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, Núñez, H.J., M., Carlos Parajó, J., 2001, Natural antioxidants from residual sources, *Food chemistry*, 72, 145-171.
- Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2002, Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage, *Methods in enzymology*, 348, 260-270.
- Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilibert, I., 1998, Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion, *Free radical biology & medicine*, 25(9), 1057-1065.
- Papetti, A., Daglia, M., Grisoli, P., Dacarro, C., Gregotti, C., Gazzani, G., 2006, Anti- and pro-oxidant activity of Cichorium genus vegetables and effect of thermal treatment in biological systems, *Food chemistry*, 97, 157-165.
- Pękal, A., Drózdź, P., Biesaga, M., Pyrzynska, K., 2012, Screening of the antioxidant properties and polyphenol composition of aromatised green tea infusions, *Journal of the science of food and agriculture*, 92, 2244-2249.
- Pękal, A., Pyrzynska, K., 2014, Evaluation of aluminum complexation reaction for flavonoid content assay, *Food analytical methods*, 7(9), 1776-1782.
- Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvanan, V., Grant, R., 2003, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography B*, 785, 263-275.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in plant science*, 2, 152-159.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Haan, L., Spenkeiink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Zanden, J.J., Woude, H., Alnk, G.M., Koeman, J.H., 2002, The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental toxicology and pharmacology*, 11, 321-333.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., 2002, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177, 67-80.
- Samra, M.A., Chedea, V.S., Economou, A., Calokerinos, A., Kefalas, P., 2011, Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry, *Food chemistry*, 125, 622-629.

- Simić, A., Manojlović, D., Šegan D., Todorović, M., 2007, Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics, *Molecules*, 12, 2327-2340.
- Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., 2004, Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35, 913-920.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free radical biology & medicine*, 18(2), 321-336.
- Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M., Furuno, K., 1999, Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid, *Free radical biology & medicine*, 27(11/12), 1313-1323.
- Tien, M., Berlett, B.S., Levine, R.L., Chock, P.B., Stadtman, E.R., 1999, Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation, *Proceedings of the national academy of sciences*, 96, 7809-7814.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-biological interactions*, 160, 1-40.
- Verdan, A.M., Wang, H.C., García, C.R., Henry, W.P., Brumaghim, J.L., 2011, Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites, *Journal of inorganic biochemistry*, 105, 1314-1322.
- Yen, G.-C, Duh, P.-D., Tsai, H.-L., 2002, Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid, *Food chemistry*, 79, 307-313.
- Yi, Z.C., Liu, Y.Z., Li, H.X., Wang, Z., 2009, Prooxidant action of chebulinic acid and tellimagrandin I: causing copper-dependent DNA strand breaks, *Toxicology in vitro*, 23(3), 425-431.
- Zheng, L.F., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L., 2006, DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship, *Free radical biology & medicine*, 41, 1807-1816.
- Zheng, L.F., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L., 2008, Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: mechanism and structure-activity relationship, *Food and chemical toxicology*, 46, 149-156.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Esin Akyüz
Doğum Yeri	Bakırköy
Doğum Tarihi	12.11.1984
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0506 637 2686
E-Posta Adresi	kondakci@istanbul.edu.tr
Web Adresi	http://aves.istanbul.edu.tr/4955/



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya Bölümü
Mezuniyet Yılı	17.07.2008

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya Programı
Mezuniyet Tarihi	26.01.2012

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı
Programı	Program Adı
Mezuniyet Tarihi	20.10.2017

Makale ve Bildiriler	
Makaleler	
Akyüz, E., Sözgen Başkan, K., Tütem, E., Apak, M.R., 2017, Novel protein-based solid biosensor for determining prooxidant activity of phenolic compounds, <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> , 65, 5821-5830.	
Bal Demirci, T., Şahin, M., Akyüz, E., Özyürek, M., Ülküseven, B., Apak, M.R., 2015, Synthesis and antioxidant activities of transition metal complexes based 3-hydroxysalicylaldehyde-S-methylthiosemicarbazone, <i>Spectrochimica acta part a-molecular and biomolecular spectroscopy</i> , 138, 866-872.	

Bal Demirci, T., Şahin, M., Özyürek, M., Kondakçi, E., 2014, Synthesis, antioxidant activities of the nickel(II), iron(III) and oxovanadium(IV) complexes with N₂O₂ chelating thiosemicarbazones, *Spectrochimica acta part a molecular and biomolecular spectroscopy*, 126, 317-323.

Bekdeşer, B., Özyürek, M., Akyüz, E., Apak, M.R., 2016, A novel spectrofluorometric probe for determination of peroxy nitrite anion scavenging activity of biothiols and amino acids, *Analytical sciences*, 32, 1315-1320.

Kondakçi, E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2013, Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method, *Talanta*, 115, 583-589.

Sözgen Başkan, K., Tütem, E., Akyüz, E., Apak, R., 2015, Assessment of the contributions of anthocyanins to the total antioxidant capacities of plant foods, *European food research and technology*, 241, 529-541.

Sözgen Başkan, K., Tütem, E., Akyüz, E., Ozen, S., Apak, M.R., 2016, Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction, *Talanta*, 147, 162-168.

Bildiriler

Akyüz E., Bekdeşer B., Özyürek M., Apak M.R., "Determination of Peroxynitrite Anion Scavenging Activity of Biothiols", 10th Aegean Analytical Chemistry Days, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, 29 Eylül - 2 Ekim 2016, pp.182-185.

Akyüz E., Sözgen Başkan K., Tütem E., Apak M.R., "Development of An On-Line Liquid Chromatographic Method for The Determination of Simple Carbohydrates in Foods", 9th Aegean Analytical Chemistry Days, AACD2014, Chios, YUNANISTAN, 29 Eylül - 3 Ekim 2014, pp.126-126.

Akyüz E., Türkoğlu S., Sözgen Başkan K., Tütem E., Apak M.R., "Ham ve Olgun Kudret Narı ile Ticari Ürünlerinin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması", XIV. Ulusal Spektroskopi Kongresi, ELAZIĞ, TÜRKİYE, 29-31 Mayıs 2015, ss.20-20.

Kondakçi E., Bener M., Özyürek M., Güçlü K., Apak M.R., "Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Fiber Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Geliştirilmesi", 26. Ulusal Kimya Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 1-6 Ekim 2012, ss.80-80.

Kondakçi E., Özyürek M., Güçlü K., Apak R., "Polifenolik Bileşiklerin Pro-oksidan Aktivitelerinin Ölçümü İçin Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi", Uluslararası Katılımlı XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 1-4 Mayıs 2011, ss.102-102.

Sözgen Başkan K., Akyüz E., Tütem E., Apak M.R., Uzun M., "Ham ve İşlenmiş Gıdalarda Toplam Şeker Tayini için Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem

Geliştirilmesi", 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, KAHRAMANMARAŞ, TÜRKİYE, 1-5 Eylül 2014, ss.48-48.

Sözgen Başkan K., Tütem E., Akyüz E., Apak M.R., "Bitkisel Gıdaların Toplam Antioksidan Kapasitelerine Antosiyaninlerin Katkısının Belirlenmesi", 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, KAHRAMANMARAŞ, TÜRKİYE, 1-5 Eylül 2014, ss.37-37.

Şahin M., Bal Demirci T., Özyürek M., Akyüz E., Ülküseven B., Apak M.R., "Synthesis and antioxidant activities of oxovanadium(IV) complexes of 3-hydroxy-S-methylthiosemicarbazones", Congress of Chemist and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with International Participation , Srajeova, BOSNA HERSEK, 10-13 Ekim 2014, pp.86-86.