

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’DE YETİŞEN ENDEMİK (*Nepeta nuda* subsp. *lydiae*)
BİTKİSİNE AİT FARKLI EKSTRELERİN ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE FENOLİK
BİLEŞİKİÇERİKLERİNİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ**

Abdölmelik ARAS

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

DİYARBAKIR

ARALIK - 2016

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR

Abdülmelik ARAS tarafından yapılan "Türkiye'de yetişen endemik *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisine ait farklı ekstraktların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik içeriklerinin LC-MS/MS ile analizi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı

Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

Üye : Prof. Dr. Sait ERDOĞAN

Üye : Doç. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cemil AYDOĞAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 30.12.2016

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylım.

.../.../201...

Doç.Dr. Sevtap Sümer EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın tüm safhalarında yardımlarını esirgemeyen ve titizlikle takip ederek tez danışmanlığımı yürüten değerli hocam Prof. Dr. Mehmet DOĞRU'ya ve akademik yaşam ile ilgili tecrübelerini benimle paylaşan, tez çalışmalarımın gerçekleşmesi için her türlü imkânı sağlayan ortak danışman hocam Doç. Dr. Ercan BURSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca öğrenciliğim süresince yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Sait ERDOĞAN'a, Doç. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN'e, Yrd. Doç. Dr. Medeni AYKUT'a ve LC-MS/MS ile analiz çalışmalarındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ALKAN'a, çalışmada kullandığımız bitkinin temin ve teşhisini yapan Doç. Dr. Ömer KILIÇ'a, antimikrobiyal çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN'a, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya'da Yüksek Lisanslarını tamamlayan arkadaşlarım Muzaffer SİLİNSİN ve Mehmet Nuri BİNGÖL'e, teşekkür ederim.

Manevi dayanaklarım annem, babam, eşim ve oğlum Ahmed Said'e özellikle teşekkür ederim.

Çalışmalarımızı destekleyen Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve bu çalışmanın deneysel kısımlarının gerçekleştiği Muş Alparslan Üniversitesi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

DESTEK

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından “Türkiye’de yetişen endemik *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisine ait farklı ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik içeriklerinin LC-MS/MS ile analizi” başlıklı Doktora Tezi ZGEF.15.002 nolu proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
DESTEK.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
KISALTMA VE SİMGELER.....	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	1
1.1.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	5
1.1.1.1 Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\bullet-}$).....	5
1.1.1.2 Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet-}$)	6
1.1.1.3 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	6
1.1.1.4 Singlet Oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$).....	6
1.1.1.5. Endojen Kaynaklar.....	7
1.1.1.6. Eksojen Kaynaklar	7
1.2. Antioksidanlar	8
1.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	10
1.2.1.1 Enzimatik Antioksidanlar.....	11
1.2.1.2. Doğal Antioksidanlar	14
1.2.1.3 Sentetik Antioksidanlar.....	15
1.2.2. Antioksidan Etkiler	17
1.3. Antimikrobiyal Maddeler ve Sekonder Metabolitler.....	17
1.3.1. Sekonder Metabolitlerinin Bitkideki Fonksiyonları.....	19
1.4. Fenolik Asitler.....	20

1.5.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> Bitki Türü.....	21
2.	KAYNAK ÖZETLERİ	27
3.	MATERYAL VE METOT	29
3.1.	Materyal.....	29
3.1.1.	Kullanılan Bitki Materyali.....	29
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.2.1.	Ferrik Tiyosiyanat Aktivite Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	29
3.1.2.2.	Total İndirgeme Kapasitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler (FRAP).....	30
3.1.2.3.	Kuprak Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	30
3.1.2.4.	DPPH [•] Serbest Radikal Giderme Aktivitesi ile İlgili Çözeltiler	30
3.1.2.5.	ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	31
3.1.3.	Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	31
3.2.	Metot.....	32
3.2.1.	Su Ekstrelerinin Hazırlanması.....	32
3.2.2.	Etanol Ekstrelerinin Hazırlanması.....	32
3.2.3.	FRAP Yöntemi ile İndirgeme Kapasitesi.....	32
3.2.4.	DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi.....	33
3.2.5.	ABTS (2,2-Azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) Radikali Giderme Aktivitesi.....	33
3.2.6.	KUPRAK Metoduna Göre İndirgeme Kuvveti Tayini	34
3.2.7.	Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	34
3.2.8.	LC-MS /MS ile Fenolik İçerik Analizi	34
3.2.8.1.	Test Çözeltisi Olan Bitki Ekstresinin Hazırlanması.....	34
3.2.8.2.	Cihazlar ve LC-MS/MS İçin Kromatografik Koşullar.....	35

3.2.8.3.	MS Cihazlandırılması.....	35
3.2.9.	Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi.....	35
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
4.1.	FRAP Yöntemi ile İndirgeme Kapasitesi ile İlgili Çalışma Bulguları.....	37
4.2.	DPPH [•] Radikalı Giderme Kapasitesi ile İlgili Çalışma Bulguları.....	38
4.3.	ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi Bulguları.....	40
4.4.	Kuprak Metoduna Göre İndirgeme Kuvveti Tayini Bulguları.....	42
4.5.	Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları.....	43
4.6.	Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	44
4.7.	LC-MS /MS ile Fenolik İçerik Analizi Bulguları.....	47
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
6.	KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....		89

ÖZET

TÜRKİYE’DE YETİŞEN ENDEMİK (*Nepeta nuda* subsp. *lydiae*) BİTKİSİNE AİT FARKLI EKSTRELERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞİK İÇERİKLERİNİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Abdölmelik ARAS

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

2016

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için ABTS (2,2’-azinobis 3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) radikal giderme aktivitesi, DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP (ferrik iyonları indirgeme gücü) ve CUPRAC (kuprik iyonları indirgeme kapasitesi) biyoanalitik metotları in vitro olarak çalışıldı. Antioksidan çalışmalarda sonuçlar standart antioksidanlar BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırıldı. Bu çalışmada *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin liyofilize su ekstresinin DPPH radikal giderme aktivitesi ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kuvveti orta düzeyde, ABTS radikal giderme aktiviteleri ile ferrik (Fe^{3+}) indirgeme kuvveti ise düşük seviyede aktivite gösterdiği tespit edildi.

Bununla beraber ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu çalışmada, *Nepeta nuda* subsp. *Lydiae* ekstresi *B.megaterium*’a karşı en yüksek anti-bakteriyel aktivite sergilerken en düşük etkisini *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*’ye karşı sergilemiştir. *C. albicans*’a karşı yüksek antifungal aktivite gösterirken *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae*’a karşı herhangi bir etki göstermemiştir.

LC-MS/MS analiz metodu ile *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin fenolik içerik analizi yapıldı. Kuinik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit ve kumarik asit en çok bulunan fenolik bileşikler oldu. Kafeik asit, kaempferol, luteolin, apigenin, rhamnetin vekrisin fenolik asit miktarları nisbeten daha az olduğu belirlendi. Sonuç olarak *Nepeta. nuda* subsp. *lydiae* ekstreleri yüksek miktarda fenolik bileşik içermeleri biyolojik faaliyetler ile ilişkilendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Antimikrobiyal aktivite, Fenolik bileşik, *Nepeta nuda*, Radikal giderme.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF DIFFERENT EXTRACTS OF
Nepeta nuda subsp. *lydiae* WHICH GROWS IN TURKEY NATURALLY AND ANALYSIS
OF PHENOLIC CONTENTS BY USING LC-MS/MS

PhD THESIS

Abdülmelik ARAS

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE
2016

The antioxidant activities of ethanol and water extracts of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* leaves were determined by different in vitro methods such as; DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC assays. The results were compared to BHA, BHT and ascorbic acid as standard antioxidant compounds. Both water and ethanol extracts presented moderate antioxidant potential on DPPH free radical scavenging assay and CUPRAC assay. Also, both extracts presented low level on ABTS and FRAP assays.

Also, the antimicrobial activity of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* was determined by the disc diffusion method. In this study, the extract of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* showed the highest antibacterial activity against the *B. megaterium*. At the same time the lowest antibacterial activity was showed against *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. The extract of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* showed the highest antifungal activity against *C. albicans* but it did not show any significant antifungal activity against *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae*.

In another step of this study, phenolic compounds of *Nepeta nuda* subsp. *Lydiae* leaves were identified by LC-MS/MS. Chlorogenic acid, rosmarinic acid, coumaric acid and quinic acid, were found to be the most abundant compounds in the methanol extract of *N. nuda* subsp. *lydiae*, among the twenty-seven compounds studied by LC-MS/MS. Also, smaller amounts of kaempferol, p-coumaric acid, tr-caffeic acid, apigenin, luteolin and rhamnetin were identified, quantitatively. In conclusion, leaves of *N. nuda* subsp. *lydiae* have high potential of phenolic contents that mainly attributed with biological activities.

Key words: Antioxidant activity, Antimicrobial activity, *Nepeta nuda*, Phenolic compound, Radical scavenging.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	Radikaller, simgeleri ve özellikleri	4
Çizelge 1.2.	Hücre içi antioksidanlar	11
Çizelge 1.3.	Hücre dışı antioksidanlar	13
Çizelge 1.4.	Hücre membranı antioksidanları	14
Çizelge 2.1.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> genel taxon bilgileri	23
Çizelge 4.1.	Standart antioksidanların ve <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> 'nin radikal giderme IC ₅₀ değerleri.	41
Çizelge 4.2.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisinin antimikrobiyal özelliğinin standart antibiyotiklerle karşılaştırılması	45
Çizelge 4.3.	Standart olarak alınan fenolik bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri	48
Çizelge 4.4.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisi fenolik bileşiklerinin kantitatif sonuçları	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu	8
Şekil 1.2.	Sıklıkla kullanılan bazı doğal ve sentetik antioksidanların açık kimyasal yapıları	16
Şekil 1.5.1.	Doğal ortamda <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> fotoğrafı	24
Şekil 1.5.2.	<i>N. nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> P.H. Davis a-çiçek, b-kaliks, c-kaliks dışı, d-yaprak, e-brakte, f-brakteol, g-genel görünüş, h-gövde tüylenmesi, i-yaprak tüylenmesi	25
Şekil 4.1.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisi etanol ve su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) FRAP yöntemi indirgeme aktivitelerinin BHA, BHT ve askorbik asit antioksidan standartları ile karşılaştırması	38
Şekil 4.2.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisi liyofilize etanol ve su ekstraktlarının değişik derişimlerdeki (10-30 µg/ml) DPPH• giderme aktivitelerinin standart birer antioksidan olan askorbik asit, BHA ve BHT ile karşılaştırması	39
Şekil 4.3.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisi etanol ve su ekstraktlarının farklı derişimlerde (10-30 µg/ml) ABTS ⁺⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan askorbik asit, BHA, BHT ile karşılaştırılması	41
Şekil 4.4.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisi etanol ve su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) Kuprak yöntemi indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması	42
Şekil 4.5.	Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini	43
Şekil 4.6.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883- <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> inhibisyon zonları görünümü	46
Şekil 4.6.2.	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32 - <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> inhibisyon zonları görünümü	46
Şekil 4.6.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 – <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>Lydiae</i> inhibisyon zonları görünümü	47
Şekil 4.6.4.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229- <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> inhibisyon zonları görünümü	47
Şekil 4.6.5.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923- <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> inhibisyon zonları görünümü	47

Şekil 4.6.6.	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048- <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> inhibisyon zonları görünümü	47
Şekil 4.7.1	UHPLC-ESI-MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin kalibrasyon kromatogramları	49
Şekil 4.7.2.	UHPLC-ESI-MS/MS ile <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> kromatogramları	50
Şekil 4.7.3.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> bitkisinin bazı fenolik bileşiklerinin açık kimyasal yapıları	52
Şekil 5.1	Bir antioksidanın DPPH [•] radikalini gidermesi	62
Şekil 5.2.	ABTS'nin kimyasal yapısı	64

KISALTMA VE SİMGELER

ATP	: Adenozin Trifosfat
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
A _{kontrol}	: Kontrol numunesinin absorbansı
A _{numune}	: Numune absorbansı
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	: İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DMPD	: N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür
DMPD ^{•+}	: N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür radikali
TCA	: Triklorasetik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş)
UV	: Ultraviyole
TBHQ	: Tersiyer butilhidrokinon

PG	: Propil Gallat
NDGH	: Nondihidroguairatik asit
IC ₅₀	:Ortamdaki serbest radikallerin konsantrasyonun yarısının inhibisyonuna neden olan maddenin konsantrasyonu



1.GİRİŞ

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha çok ortaklanmamış elektron taşıyan molekül veya atomlara denir (Mercan 2004). Bu elektronlar atom veya molekülün üstüne konulan nokta ile gösterilirler (Akkuş 1995). Karşı spin yönünün bir elektron kazanma isteğinden dolayı serbest radikallerde reaktivite oluşur (Deaton ve Marlin 2003).

Serbest radikaller organizmalarda sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sisteminin ortadan kaldırılmasına sebep olduğu moleküllerdir. Bu mekanizmada serbest radikallerin meydana gelmesi ve bunların antioksidan sistemlerce bertaraf edilmesi arasında bir denge söz konusudur ki buna “oksidatif denge” denir. Oksidatif denge sağlandığı süre boyunca organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığında veya serbest radikal oluşumu artığında oksidatif denge serbest radikaller yönüne kayar ve bu durumda oksidatif stres meydana gelir (Serafini ve Del Rio 2004, Hermes-Lima ve Zenteno-Savin 2002).

1.1. Serbest Radikaller

Dış orbitalinde eşleşmemiş tek elektron içerdikleri için kimyasal olarak çok aktif olan atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Serbest radikaller, aerobik organizmalarda normal hücre içi metabolizmanın doğal bir sonucu veya iyonize radyasyon, UV ışınları, karsinojenik bileşikler, çevresel kirleticiler gibi eksojen kaynaklı olarak şekillenmektedir. Oksijen veya moleküler oksijen aerobik organizmaların hayatta kalabilmeleri için gereklidir. Normal hücrelerdeki aerobik metabolizma süresince, oksijen aracılığı ile besinlerden ATP üretilmektedir. Bu işlem boyunca oksijen 4 basamaklı reaksiyonlar zinciri ile H₂O’ya indirgenmektedir. Oksijen metabolizması, yüksek düzeyde reaktiviteye sahip reaktif oksijen türlerinden (ROT); süperoksit radikali (O₂•), hidroksil radikali (OH•) ile radikal olmayan hidrojen peroksit (H₂O₂)’i üretir (Dizdaroglu ve Jaruga 2012, Kalyanaraman 2013).

Kuantum kimyasına göre bir bağın yapısına sadece iki elektron girer ve bu iki elektron zıt spinli olmak zorundadır. Şöyle ki iki elektrondan birinin yönü aşağı doğru iken diğ erinin yönü yukarı doğru olmalıdır. Bu elektron çiftleri son derece kararlıdır.

1.GİRİŞ

İnsan vücudunda bulunan hemen hemen bütün elektronlar, elektron çifti halindedir. Bir bağ koparsa elektronların ya ikisi de bir atoma kalır veya birbirinden ayrılarak her biri farklı bir atomda kalır. Birlikte bulunurlarsa oluşacak atom bir iyon olur. Elektronlar birbirinden ayrılırsa serbest radikal oluşur. Eşleşmemiş olan bu elektronlar çok yüksek enerjiye sahiptir ve elektronlardan eşleşmiş olanları da ayırıp işlevlerine engel olurlar. Bu hal serbest radikalleri bazen zararlı bazen de yararlı yapar (Nelson ve Cox 2004, Bursal 2009).

Radikaller, kimyasal bir organik molekül veya basit bir atom halinde olabilir. Bütün biyokimyasal ve kimyasal tepkimeler her zaman atomların en dış yörüngelerindeki elektronların seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron olması, o kimyasal bileşik veya atomun reaktivitesini olağanüstü bir şekilde artırır. Bu sebeple serbest radikaller reaktivitesi çok yüksek kimyasal maddelerdir. Bazı elementler, atomik yapılarında ortaklanmamış elektron içerdikleri için, doğada atomlar olarak değil; moleküler şekilde bulunurlar. Örneğin oksijen, hidrojen, azot ve diğer bazı elementler doğada atomik halde serbest bulunmazlar. Soygazlar olarak adlandırılan elementler ise bütün yörüngeleri elektronlarla dolu olduğundan son derece kararlı bir halde olup serbest atom halinde bulunurlar ve reaktiviteleri yoktur (Kılınç 2002).

Radikaller, paylaşılmamış elektrondan dolayı stabil olmayan, çok kısa yarı ömürlü maddelerdir. Hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} gibi bazı geçiş metalleri de eşleşmemiş elektronları olduğu halde serbest radikal değildirler. Fakat serbest radikallerin oluşmasında önemli rol alırlar. Ortaklanmamış elektronu olan moleküller yüksek derecede reaktiftirler, proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi değişik yapılarda yıkıcı peroksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar (Hollszky 1984).

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlarından dolayı çok aktiftirler ve ortamda bulunan diğer biyomoleküllere saldırarak onların biyolojik yapılarını bozarlar. Bu radikalik ve reaktif ara ürünler proteinler, lipidleri ve nükleik asitleri oksitleyebilir ve metabolizmada olumsuz neticeler oluşturabilirler. Antioksidan sistemler bu reaktif ve radikal ara ürünleri gidererek olumsuz etkilerinin ortadan kalkmasını sağlarlar (Fantel 1996, Temple 2000, Stadtman 2002).

3

1.GİRİŞ

Aerobik organizmalardareaktif oksijen türevleri olan moleküler oksijen türleri reaktif moleküller üretilir. Bu reaktif moleküllerhem kısa ömürlüdür, hemde radikal olmayan diğer maddeler ile reaksiyon vererek yeni radikaller oluşturur ve zincir reaksiyonların başlamasına sebep olur (Sen 2001).

Reaktif oksijen türlerinin mitokondriyal hasardan dolayı hücrenin ve tüm organizmanın yaşlanmasında önemli bir faktör oldukları düşünülmektedir (Cortopassi 1999). Reaktif türlerden bazıları insan metabolizmasının vazgeçilmez bir parçasıdır ve anormal şartlarda konsantrasyona bağlı olarak artış gösterebilir. Bazı reaktif türler ise insan vücudunda çok az üretilir ya da hiç üretilmez; dış kaynaklı olarakta alınabilir. Sigara dumanı, hava kirliliği, pestisitler, radyasyon, serbest geçiş metali iyonları gibi iç ya da dış kaynağa bağlı olarak meydana gelebilir (Gülçin ve ark. 2003).

Çizelge 1.1.Radikaller, simgeleri ve özellikleri (Çöllü 2007, Kırıl 2012).

Radikal	Simge	Özellikler
Hidrojen	H•	Bilinen en basit radikal
Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂	Moleküler hasar yeteneği zayıf, reaktivitesi çok düşük
Tekli oksijen	O ₂ •	Güçlü oksidatif oksijen formu, yarılanma ömrü hızlı
Süperoksit	O ₂ •	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH•	Oksijen metabolitlerinden en toksik olanı
Perhidroksi radikal	HO ₂ •	Lipitlerde hızlı çözülerek lipit peroksidasyonu artırır
Peroksil radikal	ROO•	Daha zayıf etkili, lipitlerde lokalize olur
Tiol radikali	RS•	Eşleşmemiş elektron ve sülfür içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO•	Organik peroksitlerin parçalanmasıyla oluşan oksijen metabolitleri
Triklorometil	CCl ₃	CCl ₄ metabolizma ürünü bir radikal, karaciğerde üretilir
Azot monoksit	NO	L-arjinin amino asitinden üretilir
Azot dioksit	NO ₂	Oksijenin NO ile reaksiyonundan üretilir

1.1.1. Serbest Radikal Kaynakları

Normal hücrede mitokondriyal elektron transport zincirindeki sızıntı en büyük serbest oksijen radikalleri kaynağıdır. Mitokondrilerin i zarlarında da gerçekleşen oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri indirgendiğinde mitokondriyal süperoksit radikal üretiminde artış olur (Akkuş 1995).

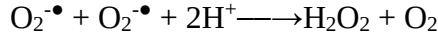
Hücrelerde oluşan serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklıdır. Ekzojen olanlar allokzan, parakuat gibi kimyasal maddelerin etkisi, parasetamol, karbon tetraklorür gibi ilaç toksikasyonları, ultraviyole veiyonize radyasyon, hava kirliliğine sebep olan fitokimyasallar, solventler, sigara dumanları gibi dış kaynaklar gösterilebilir (Gülçin ve ark. 2003).

En önemli serbest oksijen radikalleri şunlardır (Ercan 2008).

1. $O_2^{\bullet-}$ (Süperoksit) Radikali
2. $HO^{\bullet}$ (Hidroksil Radikali)
3. H_2O_2 (Hidrojen Peroksit)
4. Singlet Oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$) radikali

1.1.1.1 Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Canlı organizmalarda birçok sebepten oluşabilir. Oluştuğu yerden çok uzağa difüze olmaz ve ROT oluşur. Moleküler oksijende dış orbitalde elememi iki elektron vardır. Bu elektronların yörüngeleri farklı ve spinleri aynı doğrultuda olduğundan enerji seviyeleri çok düşüktür. Fakat orbitaller birer elektron daha alabilir. Bir tek elektron daha almasıyla süperoksit anyon radikalleri meydana gelir (Fridovich 1975). Bu durum oksijen kullanan bütün hücrelerde gerçekleşebilir. Bu radikal oluşumunda elektron transport zincirinin etkisi büyüktür (Halliwell 1999, Halliwellve Gutteridge 1990). Bu radikaller hem oksidan hem de indirgen özelliktedirler. Dopamin, adrenalin, hidroksil amini oksitler veya askorbat, sitokrom C veya nitroblue tetrazolium'u indirgerler (Bast ve ark. 1991). Bu radikal türleri diğerlerine nisbetleok zararlı değillerdir. Fakat hidrojen peroksit kaynağı olduğundan ve geçiş metalleri indirgeyebildiğinden son derece önemlidir. İki süperoksit oksijen molekülü proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşür (Nodberg ve Arner 2001).



1.1.1.2. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidrojen peroksit ve metal iyonu varlığında oluşan biyolojik moleküllere en kuvvetli atak yapan bu radikallerdir. OH•biyolojik sistemlerde ortalama 10^{-9} saniyelik yarılanma ömrü olan son derece güçlü bir oksidandır. En toksik radikal olduğu düşünülmektedir. Proteinler, nükleik asitler ve lipitlerde dahil olmak üzere neredeyse bütün biyolojik molekülleri okside edebilir (Fantel 1996).Hidroksil (OH•) radikalının biyomoleküllerle olan güçlü aktivitesinden dolayı başka reaktif oksijen türlerine (ROT) göre biyolojik sistemlere daha çok hasar verir (Betteridge 2000).

1.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit serbest radikal değildir. Demir, bakır gibi geçiş metaller ile serbest radikal oluşturur ve hücre membranının içine ve dışına geçebilir. Moleküler oksijen çevreden iki elektron alarak veya O₂••anyonu bir elektron alarak peroksit molekülünün oluşumuna sebep olur. Peroksit molekülü de iki H⁺ ile birleşerek H₂O₂'i meydana getirir (Cheesman ve Slater 1993).

H₂O₂'in diğer önemli bir özelliği de intrasellüler iletişim molekülü olarak vazife görmesidir (Rhee 1999). İnsan metabolizmasında saatte ortalama 3×10^9 adet toksik özellikte H₂O₂ molekülü meydana gelmektedir (Wickens 2001).

1.1.1.4. Singlet Oksijen (O₂^{↑↓})

Oksijenin enerji verilerek uyarıldığı bu formunda spin kısıtlaması olmadığından dolayı reaktivitesi oldukça yüksektir. Dışarıdan almış olduğu enerjiyi dışarıya dalga enerjisi şeklinde yayıp oksijen haline dönebildiğinden, oluşumu kemilüminesans ölçümü ile izlenebilir. Singlet oksijende çiftleşmemiş elektron olmadığından bu reaktif oksijen türü radikal değildir. Oksijenin mutajenik ve yüksek enerjili bir formudur. Oksijenin çiftleşmemiş elektronlarından birine enerji verilmesiyle olduğu orbitalden diğer bir orbitale geçmesi veyahut spin yönünün tersine yer değiştirmesi sonucunda oluşur (Cross ve ark. 1987, Ames ve ark. 1993, Halliwell ve Gutteridge 1999).

Serbest radikaller organizmaya günlük yaşamını sürdürmesi, metabolik faaliyetlerini sürdürebilmesi için lazım olan reaksiyonların sonunda oluştuğu gibi radyasyon ve stres gibi dış etmenlerintesiiriyle de oluşabilmektedir. Dolayısıyla serbest radikal kaynakları eksojen ve endojen olarak iki grupta incelemek mümkündür.

1.1.1.5. Endojen Kaynaklar

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Redoks tepkimeleri
- Endoplazmik retikulum
- Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimi ki; buna "enzimatik lipid peroksidasyonu" denir.
- Endotelyal ve fagositik (monosit ve makrofajlar vs.) hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar.
- NADPH Oksidaz, Ksantin Oksidaz vs. enzimler.
- Otooksidasyon tepkimeleri (Gümüştaş ve Atukeren 2008).

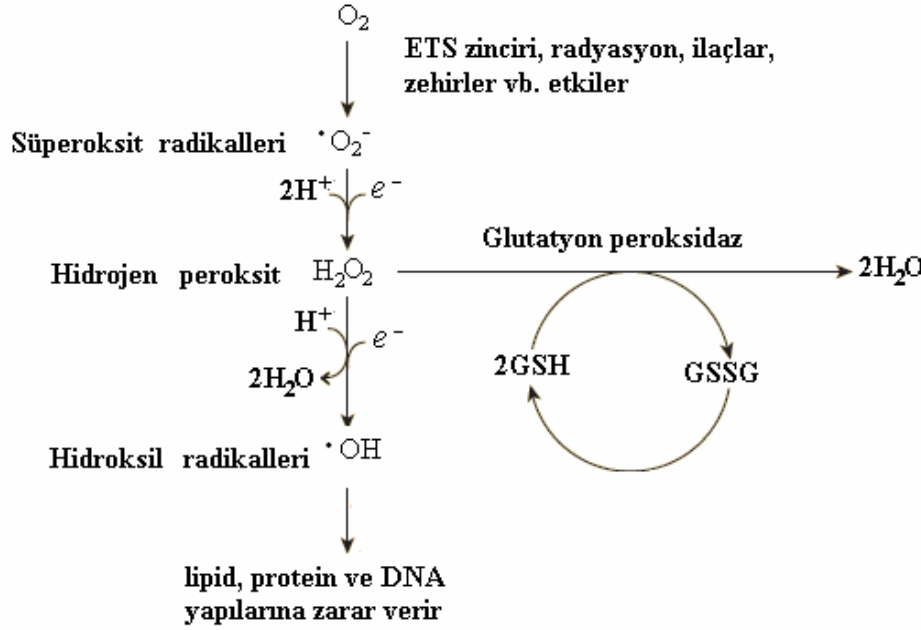
1.1.1.6. Eksojen Kaynaklar

- İlaç oksidasyonları
- Radyasyon
- Güneş ışığı, (UV) ışınları
- Egzoz gazları ve sigara dumanı,
- Kükürt dioksit
- Çevresel toksik ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, pestisitler, solventler, anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.

1.GİRİŞ

- Stres: Stresin katekolamin düzeyi artırması ve katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikal oluşumu gözlenir (Georgieva 1995, Guemouri ve ark.2005).

Metabolizmada oluşan ve dış kaynaklı radikal ve reaktiflerin oluşum yolları aşağıda Şekil 1.1’de gösterilmiştir (Nelson ve Cox 2004).



Şekil 1.1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu (Bursal 2009).

1.2. Antioksidanlar

Antioksidan maddeler, özellikle okside edilebilen substrata oranla daha düşük konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddelerdir (Sise 1997). Organizmadaki hücre ve dokular, serbest radikalleri ve radikallerin sebep olduğu tepkimeleri inhibe eden sistemlere sahiptir. Antioksidanlar bu radikalik ürünlerle hızla tepkime vererek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesine engel olan madde veya sistemler olarak tanımlanır (Aslan 1995).

Canlılar reaktif oksijen türlerine karşı vücutta organ ve hücre sistemlerini korumak için kompleks ve karmaşık antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler, radikalik ürünlerin nötralize eden ve bu yapılarla etkileşim gösteren, hem endojen hem de

eksojen orjinli farklı bileşiklerdir (Percival 1996). Zincir kırma tepkimelerinin hemen her basamağında değişik miktarlarda hidroperoksit oluşması, ortamdaki ürünler ve zararın tamamen yok edilememesinden dolayı oksidasyon tepkimeleri ve radikalik ürünler tamamen yok edilemez (Valko 2007, Gutteridge 1995).

Antioksidanlar, organizmanın oksidan-antioksidan dengesini koruyan mekanizmaların en az biri üzerinden etki ederler. Antioksidan mekanizmalar; lipid, protein ve DNA gibi moleküllerde oluşan hasarın giderilmesinde, radikalik ürünlerin temizlenmesinde, hücredeki bazı enzim tiplerindeki kayıpların önlenmesinde, serbest radikallere sebep olan kimyasal tepkimelerin durdurulması ya da tepkime hızının baskılanması gibi pek çok durumda önemli görevler yaparlar (Gutteridge 1995, Evelson 1997).

Antioksidanlar, oksidasyonun radikal zincir mekanizmasında stabil ara ürünün oluşumuna neden olan ve zincir tepkimesini kırarak şekilde tepkimeye katılan maddelerdir (Gülçin ve ark. 2011). Oluşan ürünler oksidasyon zincir tepkimesinin kırılmasına neden olduklarından yağlı gıdalarda kullanılması özellikle gerekmektedir. Antioksidanların istenen düzeyde etki gösterebilmesi için, yağ ve yağlı gıdaların üretiminde veya üretiminden hemen sonra gıdalara eklenmeli ve bitkisel ve hayvansal yağlarda çok iyi karıştırılmalı, ürünün içinde homojen olarak dağılması sağlanmalıdır (Çakmakçı ve Gökalp 1992).

Lipit oksidasyonunun önlenmesinde kullanılan antioksidanlar, etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılır. Birincisi oluşan radikallerle birleşen antioksidanlar diğeri ise yağ asidinin parçalanması ile meydana gelen radikalın oluşumunu engelleyen antioksidanlardır. Bu iki tür antioksidan birlikte kullanıldıklarında sinerjistik etki göstererek antioksidatif etkiyi dahada artırır (Gök 2006).

1.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanların sınıflandırılması aşağıdaki gibi yapılabilir.

Yapılarına göre:

- Enzimatik

- Non-enzimatik

Çözünürlüklerine göre:

- Suda çözünenler (C Vitamini, Glutasyon, Sistein, Ürik asit, Glukoz)
- Lipidlerde çözünenler (β -karoten, E Vitamini, Flavonoidler, Bilirubin,)

Kaynaklarına göre:

- Organizmadabulunanlar (Endojen) (Katalaz, α Tokoferol, SOD)
- Dışarıdan alınanlar (Ekzojen) (Adenozin, Allopurinol)

Yerleştikleri yere göre:

- İntrasellüler (SOD, Glutasyon peroksidaz, Katalaz)
- Ekstrasellüler (Askorbik asit, Transferrin, Albumin) (Baykal, 1998).

Endojen antioksidanlar günlük yaşamda karşılaşılması mümkün olan oksidatif stres etmenlerinin ortadan kaldırılması ve fizyolojik işleyişin devamında önemlidirler (Clarkson 2000). Antioksidanlar organizmada bulundukları yere veya etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler (Gutteridge 1996, Jill 1995). Organizmadaki lokalizasyonlarına göre sınıflandırma Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.2.Hücre içi antioksidanlar (Gutteridge 1996).

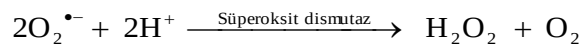
Hücre İçi Antioksidanlar (Enzim Olanlar)	
Sitokrom oksidaz (Sit O)	O ₂ ETS içinde suya indirgendiğinde elektron kaçaklarını ve O ₂ , H ₂ O ₂ , HO [•] salınımını engeller.
Katalaz (CAT)	Yüksek konsantrasyonlardaki H ₂ O ₂ 'yi giderir.
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Glutasyon peroksidaz, H ₂ O ₂ miktarının fazla olduğu durumlarda H ₂ O ₂ katalizlemekle beraber organik hidroperoksit radikallerini giderir.
Glutasyon peroksidaz (GSH)	Gpx H ₂ O ₂ , lipid peroksitleri, semidehidroaskorbat radikali ve E vitamini giderir.
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit radikalini (O ₂ ^{•-}) katalitik olarak uzaklaştırır.

Organizmada hücre içinde bulunan antioksidan sistemler hücre dışındaki sıvılarda bulunmaz. Fakathcre dışındaki bu sıvılarda protein şeklinde bulunan SOD ve GPx enzimleri, ROT ile karşı karşıya kalındığında devreye girerek antioksidan görevi üstlenirler.

1.2.1.1 Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz:

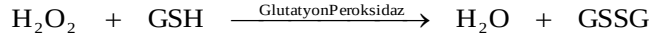
SOD, GPx ve CAT ile birlikte hücrelerdeki O₂^{•-} düzeyini kontrol etmektedir. SOD süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizlemektedir. SOD tarafından katalize edilen tepkime ile bir O₂^{•-} radikali yükseltgenirken diğer O₂^{•-} radikali ise H₂O₂'ye indirgenmektedir (Wadington ve ark. 2000).



SOD aktivitesinin eritrositler gibi oksijen taşınması yüksek olan dokularda fazla olduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra granülosit fonksiyonları için de önemlidir. Fagosit edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde rol almaktadır (Akkuş 1995).

Glutasyon Peroksidaz:

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksit ve çeşitli hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Glutasyonu indirgeyici ajan olarak kullanmaktadır. GPx aktivitesindeki azalma H_2O_2 artışına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır.



Katalaz

Süperoksit dismutaz tarafından katalize edilen dismutasyon reaksiyonu sonucu oluşan H_2O_2 'yi su ve moleküler oksijene çevirmektedir.



H_2O_2 konsantrasyonunun yüksek olduğu dokularda katalazın enzimatik aktivitesi yükselmektedir. Kanseri dokularda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir (Greenwald 1990). CAT aktivitesinin çok büyük bir kısmının eritrositlerde gerçekleştiği bildirilmektedir (Akkuş 1995).

Çizelge 1.3. Hücre dışı antioksidanlar (Gutteridge 1996).

Hücre Dışı Antioksidanlar (Enzim Olmayanlar)	
Hemopeksin	Hem'in bağlanmasında görev alır.
Eritrositler	H ₂ O ₂ 'i difüzyon ile O ₂ ⁻ radikallerini anyon kanalı ile eritrosit içine alır. Buradaki SOD ve CAT ile uzaklaştırır.
Laktoferrin	Düşük pH'da molekül başına iki adet Fe ³⁺ bağlar
Transferrin	Molekül başına iki adet Fe ³⁺ bağlar
Seruloplazmin	Ferroksidaz aktivitesini gösterir, bakırın yeniden oksidasyonu sırasında H ₂ O ₂ 'i kullanır. Bakır iyonlarını non-spesifik olarak bağlar. O ₂ ⁻ radikallerini giderir.
Albumin	Cu ve Hem'i bağlanmasında, HOCl'n temizlenmesinde görev alır.
Bilirubin	Peroksili temizler (< 0.09µmol/L)
EC-SOD	Katalitik olarak speroksiti (O ₂ ⁻) uzaklaştırır
EC-GSHPx	H ₂ O ₂ ve hidroperoksitleri katalitik olarak giderir. Plazmada oldukça az miktarda GSHPx bulunur.
Glukoz	HO• radikalini giderir (4- 6µmol/L).
Mukus	Hidroksili (HO•) giderir.
Ürat	Radikal giderici ve metal bağlayıcı (0.08µmol/L) zelliğe sahiptir.
Askorbik asit	HO• radikalini giderir (65µmol/L).
Haptoglobulin	Hemoglobinin bağlanmasında görev alır.

Hücre içinde ve hücre dışında görev yapan antioksidanların etki mekanizması farklıdır. Hücre dışında görev alan bir antioksidanın etki mekanizması katalitik metal iyonlarını uzaklaştırma şeklindedir. Membranlar, hücre iinin sıvı olan ortamından farklı olarak hidrofobiktir. Membran lipofilik olduğundan burada oluşan radikaller hücre içinde oluşan radikallerden farklıdır. Dolayısıyla membranın antioksidan

1.GİRİŞ

reaktivitesi farklı olur. Yağda çözünen E vitamini membran tabakası dışında zayıf bir antioksidan olmasına rağmen membran üzerinde en güçlü ve en önemli antioksidan olarak bilinir. Çizelge 1.4'te bazı membran antioksidanları ve etki mekanizmaları verilmiştir.

Çizelge 1.4. Hücre membranı antioksidanları (Gutteridge 1996).

Membran Antioksidanları	
Vitamin E	Yağda çözünen zincir-kırıcı antioksidan
β-Karoten	Yağda çözünen radikal temizleyicisi ve singlet O ₂ inhibitörü.
Koenzim Q	Enerji metabolizmasındaki ana görevine ek
Membranın yapısal organizasyonu	Fosfolipit/Kolesterol oranı, membran bütünlüğü açısından önemli

1.2.1.2. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidan kaynakları şunlardır.

- C vitamini
- Askorbil palmitat ve askorbil stearat
- E-Vitaminleri (tokoferoller)
- Glikoz oksidaz
- Polifenolik Bileşikler
- a-Flavonoidler
- b-Fenolik asitler
- Karotenoidler
- Sülfidler:

Aşağıdaki maddeler kükürt dioksit ve tuzları gibi kullanılır.

- E 221 Sodyum sülfid
- E 224 Potasyum metabisülfid
- E 227 Kalsiyum hidrojen sülfid
- E 226 Kalsiyum sülfid

- E 223 Sodyum metabisülfit
- E 228 Potasyum hidrojen sülfit
- E 220 Kükürt dioksit
- E 222 Sodyum hidrojen sülfit (Galip 2007).

Doğal antioksidanlar bitkinin her kısmında bulunur. Doğal antioksidanlar fenoller, flavonoidler, karotenoidler, vitaminler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Bitki kaynaklı olan antioksidanlar serbest radikalleri giderici, peroksit parçalayıcı, singlet ve triplet oksijen kueneri, enzim inhibitörü ve sinerjist olarak işlev görürler (Larson 1998). Meyve ve sebzeler de birçok antioksidan bulunur (Cao ve ark.1996). Antioksidanlar; sebze ve meyve dışında tohum, yaprak, iek, kök ve kabuklarda bol miktarda bulunur (Pratt ve ark.1990). Dolayısıyla sebze ve meyvelerin bol miktarda tüketilmesi hastalıklara yakalanma riskinde önemli ölçüde azalmaya sebep olduğu gibi kansere yakalanma riskinde ve ölüm oranında da düşüşe sebep olduğu anlaşılmaktadır (Ames ve ark.1993).

En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen sayılabilir. Askorbik asit, bitkilerde ve bazı memelilerin karaciğerinde glukozdan sentezlenir. Askorbik asit bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Bunlardan en önemlisi, kollagenin biyosentezinde yer aldığı bilinen prolin aminoasidinin hidrokshiproline hidrokasilasyonu gibi reaksiyonlara katılmasıdır. Ayrıca askorbik asit dopamin-β-hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir (Padayatty ve ark.2003). Askorbik asit, turunçgillerde, domates, brokoli, ıspanak vb. yeşil yapraklı patates gibi bazı sebze ve meyvede bulunur. Askorbik asit çok hızlı oksidize olduğundan sebze ve meyvelerin pişirilme ve hazırlanma sırasında yapısında bulunan askorbik asit çoğunlukla işe yaramaz hale gelir. Bundan dolayı askorbik asit ihtiva eden besinlerin az pişirilmesi, çiğ olarak yemek mümkünse kesildiğinde kısa bir süre içinde tüketilmesi önerilir (Müftüoğlu 2003, şerbetçi 2007).

1.2.1.3. Sentetik Antioksidanlar

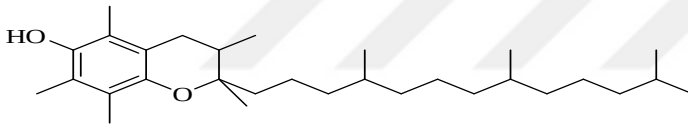
- Eritrobik asit ve sodyum eritrobat
- BHA (Butillenmiş Hidroksi Anisol)
- BHT (Butillenmiş Hidroksi Toluen)

1.GİRİŞ

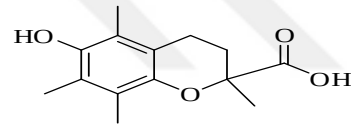
- Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)
- Gallatlar (PG = Propil Gallat)
- Nondihidroguairatik asit (NDGH) (Galip 2007).

Sentetik antioksidanlar gıdalarda; gıdaların oksidasyonu ile oluşan bozulmalar, tatlarındaki bozulma, koku oluşumu ve ihtiva ettikleri vitamin miktarlarındaki azalmalar vb. gibi sorunları çözmek ve bunların rafta kalma sürelerini uzatmak maksadıyla sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Fakat son zamanlarda sentetik antioksidanlar üzerinde yapılan bazı araştırmalarda toksik ve kanserojen olabileceği anlaşıldığından bu maddelerin kullanılmasında ciddi yasak ve sınırlamalar getirilmiştir (Haigh 1986).

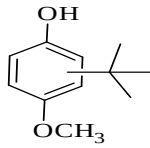
Uzun yıllardır antioksidanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), tersiyer bütillhidrokinon ve gallatlar gıdalarda kullanımı en sık olan antioksidanlardır (Şekil 1.2). Fakat bu antioksidanların sentetik olmaları, toksik etkileri, yüksek maliyetleri ve tüketicilerin katkı maddeleri hakkındaki endişelerinden dolayı son zamanlarda doğal antioksidan kullanımına yönelim başlamıştır (Formanek ve ark.2001).



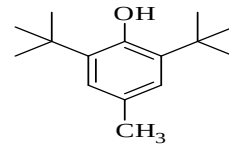
Alfa-tokoferol



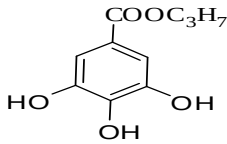
Troloks



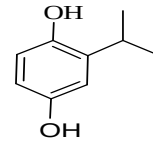
BHA



BHT



Propil gallat



TBHQ

Şekil 1.2.Sıklıkla kullanılan bazı doğal ve sentetik antioksidanların açık kimyasal yapıları

1.2.2. Antioksidan Etkiler

Antioksidan etkiler Őu Şekilde sıralanabilir

Toplayıcı etki (Scavenging etki):ROT'u etkileyerek tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme iŐlemidir. Enzimatik antioksidanlar bu Şekilde etki göstermektedir.

Bastırıcı etki (Quencer etki): ROT ile etkileşerek onlara bir elektron aktarılması suretiyle aktivitelerini azaltan veya inaktif hale getiren etki Őeklidir. Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin bu Şekilde etki göstermektedir.

Onarıcı etki (Repair etki): DNA hasarının tamiri bu Őekildedir. DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz bu Şekilde etki göstermektedir.

Zincir kırıcı etki (Chain breaking etki): Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırmak suretiyle fonksiyonlarının engellenmesine sebep olan etkidir. Seruloplazmin, hemoglobin ve mineraller bu Şekilde etki göstermektedir (Pinchuk 2002).

1.3. Antimikrobiyal Maddeler ve Sekonder Metabolitler

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları öldüren veya üremesini önleyen, doğal veya sentetik kimyasallardır. mikroorganizmaları öldüren maddeler sidal maddeler olarak adlandırılır ve aldığı  n ek öldürülen mikroorganizmanın tipini gösterir. Dolayısıyla funguslar ve bakterileri öldüren maddeler fungusidal ve bakteriyosidal maddeler olarak adlandırmak mümkün olmuŐtur. Organizmayı öldürmeden sadece üremesini engelleyen maddeler statik maddelerdir. Antimikrobiyal maddelere kaynak olan bitkiler, mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadelede etkilidirler ( opuroğlu 2013).

Primer metabolitlerden yapay yollarla elde edilmiş olan sekonder metabolitler bitkiler  lemindeki daėılıŐı özel olan bir taksonomik grup (tür, cins, familya) ile sınırlandırılmıŐtır. Bu metabolitlerin, bitkilerin primer metabolizmasındaki iŐlevleri tartıŐmalıdır ve genellikle tozlaŐma,  evresel Őartlara adaptasyon, mikroorganizmalara, böceklere ve diğer predatörlere (avcılara) karşı kimyasal savunma, başka bitkilerle yarıŐma gibi iŐlevler üstlendiği düşünülmektedir (Vanisree ve ark. 2004, Vanisree ve Tsay 2004).

Antimikrobiyal maddeler; mikroorganizmaların gelişmesini durdurucu veya onları öldürücü ajanlardır. Bu maddeler çok geniş bir grup olup bunlara antibiyotikler, dezenfektanlar, antiseptikler vb. dahildir. Antibiyotikler, canlılar tarafından meydana getirilen ve çok seyreltik çözeltilerde bile bazı mikroorganizmaların üremelerini durduran veya onları öldüren bileşiklerdir (Temiz 2000).

Geliştirilen antibiyotiklere karşı bakteriler her zaman kendilerini koruyacak mekanizmalar oluşturmayı başarmaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalarda bazı suşlarda tüm antimikrobiyallere karşı direnç ortaya çıkmıştır (Moreno ve ark. 2000).

Antibiyotiklerin kullanımı ile ilişkili problemlerin ortaya çıkmasının sonucu olarak, antimikrobiyal özelliklere sahip bitkilere olan ilgide buna paralel olarak artmaktadır (Emory ve Gaynes, 1993). Araştırmacılar, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri nedeniyle bitki türlerinden izole edilen ve patojenik mikroorganizmaları yok etme özelliğine sahip, biyolojik yönden aktifbileşenlerle ilgilenmektedirler (Essawi ve Srour, 2000). Tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri konusunda yapılan çalışmaların dünyanın değişik yerlerinde gittikçe artığı rapor edilmektedir (Grosvenor ve ark. 1995).

20. yüzyılın başlarına kadar insan organizmasına zarar vermeden mikroorganizmaları etkilemenin imkânsız olduğu düşünülüyordu. M.Ö. 2500'lü yıllarda bilincinde olmadan antimikrobik tedavi yöntemleri kullanılmış ve bu devirde enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılan bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler olumlu sonuçlar vermiştir. 1600'lü yıllarda Güney Amerika'da, insanlar cinchora bitkisinin kabuğunu yiyerek sıtmadan korunmuşlar, ipeka bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanterihastalığını tedavi etmişlerdir. Cinchora bitkisinin kabuğunda kinin, ipeka bitkisinin köklerinde ise emetin bulunduğu belirlenmiştir. 20. yüzyıldan itibaren patojen mikroorganizmalar hakkında bilgiler arttıkça enfeksiyon hastalıkları ile savaş da bilinçli olarak sürdürülmüştür.

1854-1915 yılları arasında Paul Ehrlich, bir arsenik bileşiği olan arsfenamin ile sifilizi, tripan kırmızısı boyası ile Afrika uyku hastalığını tedavi etmeyi başarmıştır. 1927 yılında Almanya'da kimya endustrisi alanında çalışan Gerhard Domagk ve ekibi, çeşitli boyaların patojen bakterilere etkinliğini ve hayvanlardaki toksik etkisini

araştırmaları sırasında, deri boyamada kullanılan prontosil kırmızısı adlı boyanın hayvanlara toksik olmadığını, stafilokok ve streptokoklara etkili olduğunu saptamışlardır ve bu bulgunun 1935 yılında yayınlanmasından bir yıl sonra prontosil kırmızısının vücutta sulfanilamide dönüştüğü ve antibakteriyel aktiviteyi bu maddenin sağladığı anlaşılmıştır.

1929 yılında S. Alexander Fleming tarafından bulunan ve bu yıllarda toksik etkileri nedeniyle kullanım alanına giremeyen penisilin 1940 yılında kullanılır hale Ernest Chain ve Howard Florey tarafından getirilmiştir. Penisilin 2. Dünya Savaşı'nda yara enfeksiyonlu birçok askerin hayatının kurtulmasına sebep olmuştur. Son yıllarda antibakteriyel etki alanı daha genişlemiş ve toksik etkisi az olan, mikroorganizmaları öldürücü ya da mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösteren birçok antibiyotik ve antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olup tümüyle sentetik olan (kimyasal yolla sentez edilen) kemoterapotik maddeler üretilmiştir (Geçibesler 2013).

1.3.1. Sekonder Metabolitlerinin Bitkideki Fonksiyonları

- Bitkiyi otçulların, bakterilerin ve fungilerin patojen saldırılarına karşı korur, aynı ortamda bulunan diğer bitkilerle rekabet kabiliyetlerini artırır,
- Tozlanma sırasında yararlı organizmaları (zellikle böcekleri) eker, simbiyotik ilişkilerde görevler üstlenir.
- Bitkiyi sıcaklık değişimlerine, su, ultraviyole ışık, tuzluluk, kuraklık ve mineral madde gibi değişik çevresel stres etmenlerine karşı korur.
- Hücre düzeyindeki bitki büyüme dzenleyicilerinde, gen ekspresyon dzenleyicilerinde ve transdüksiyon mekanizmalarında görevlidirler.
- Otçullara (sürüngenler, böcekler, vb.) karşı savunma,
- Mikroorganizmalara (virusler, bakteriler, vb) karşı savunma,
- Bazı gelişmiş ekonomik ve metabolik işlevler (Osbourn 1996, Waterman 2001, Briksin 2000, Babaoğlu ve ark. 2002).

1.4. Fenolik Asitler

En az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir ve fenolik asitler olarak tanımlanırlar. Fenolik bileşiklerin en basiti bir tane hidroksil grubu bağlı olan benzen halkasıdır. Birden çok (OH) grubu içeren fenolik maddeler ise polifenol olarak tanımlanır (Evrenesoğlu 2002).

Aromatik bitkide antioksidan aktiviteiçerdiği sekonder komponentlerin miktarıyla doğrudan ilişkilidir ve "fitokimyasallar" olarak bilinirler. Bu komponentlerin miktarı bitkideki (ontogenetik,morfogenetik, diurnal ve çevresel etkenler), genetik farklılıklarından dolayı bitkiden bitkiye değişmektedir. Fenolik asit bileşikler içerisinde yoğun olarak bulunanlarfenolik asitler, flavonoitler ve fenolik terpenlerdir. Bu bileşikler ve esterlerinin antioksidan etkileribileşik içerisindeki hidroksilgrubu sayısı ile doğru orantılıdır (Rice-Evans ve ark.1996, Tohma ve ark. 2016).

Fenolikler altı üyeli aromatik benzen halkasına direkt bağlı bir (^-OH) grubu içeren ve bu (^-OH) grubundan bir proton kaybetmeye meyli olan aromatik ve zayıf asidik olan bileşiklerdir. Bu yapılar organizmada çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri süpürme işlevine sahiptirler.Fenoliklerin antioksidan aktivitesi, iyonik metallerle bileşik oluşturma (metal şelatlama) singlet oksijen oluşumunun engellenmesiya da azaltılmasığıbi fonksiyonlardan kaynaklanır. Yani bunlar, çeşitli reaktif oksijen türlerini (serbest oksijen, peroksinitrit ve hidrojen peroksit) hücrelerden uzaklaştırarak metabolizmayı zinde tutarlar (Gülçin 2010).

Bitkilerin en çok ihtiva ettiği yapıların başında fenolik bileşikler veya polifenoller gelir. Bitkilerde 6000’iaşkın fenolik yapının olduğu bilinmektedir. Bitki tarafından sentezlenen ve yapısında mevcut olan fenolik bileşiklerden bir diğeri de flavonoidlerdir. Flavonoidler, fenolik içeriklerinden dolayı antioksidan özelliğesahiptir. Flavonoidler çoğunlukla suda çözünürler. Bu grup bileşikler arasında yakın yapısal ilişkiler vardır. Flavonoid yapısındaki heterosiklik halkanın oksidasyon derecesine bağlı olarak farklı gruplar ortaya çıkmaktadır (Keskin 1981). Flavonoitlerden bir kısmı, hücre ve dokuların reaktif oksijen türlerinden etkin bir şekilde korunmasında rol alırlar (Groot ve Rauen 1998). Karoten ve skualen de doğal antioksidanlardandır. Karotenler hücreyi ışık, hava ve diğer foto sensitizisasyon etkilerinden koruyan ve bu ortamlarda

antioksidan olarak görev yapan bileşiklerdir (Krinsky 1989). Skualen ise bir serbest radikal söndürücüsü olmakla beraber aynı zamanda singlet oksijen kuençeri olarak da görev yapmaktadır (Kohn ve ark.1995).

Fenolik bileşikler bitkilerin yaprak, çiçek ve gövde kısımlarında bulunur. Bundan dolayı aromatik bitkilerin çiçek ve yaprak kısımlarının kurutulması ve drog halinde veya distilasyon, ekstraksiyon gibi metotlarla elde edilen uçucu yağ özütleri şeklinde kullanılır. Her aromatik bitkinin kimyasal yapısı farklı sebeplere bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, antioksidan etki dereceleri de değişkenlik gösterir (Arslan 2007, Soycan 2005, Dığrak 1998, Hausteen 2002).

Fenolik bileşikler ve daha yaygın olarak kullanılan ismi ile polifenoller bitkilerde fazla miktarda bulunur. Meyve ve çiçeklerin renklenmesine sebep olan, çevresel stres etmenlerine karşı bitkilerde koruma sağlayan, benzen halkasına hidroksil bağlı kimyasal bileşiklerdir (Cemeroğlu 2004, Kahkonen ve ark.1999, Ergun ve ark. 2002, Cemeroğlu 2004). Antioksidan gruplarının içerisindeki en önemli grup fenolik maddelerdir (Moure 2001).

Fenolik antioksidanlar serbest radikal giderici ve metal şelatlamada fonksiyon alırlar. Bu bileşikler ve bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkin rol oynarlar. Bazı bitkilerde bulunan fenolik bileşikler son yıllarda antioksidan kaynağı olarak kullanılmakta ve ticari amaçlarla da üretilmektedir. Diyetle koruyucu etkiye sahip antioksidan maddelerin gıdalardaki miktarlarının ve alınması gereken dozlarının bilinmesi çok önemlidir (Shahidi ve ark.1992).

1.5. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* Bitki Türü

Nepeta (*Lamiaceae*) yıllık veya uzun ömürlü bir bitki çeşididir. Avrupa, Asya, Kuzey Amerika, Kuzey Afrika'da yayılış göstermiştir (Alim ve ark. 2005). Familya yeleri, dünyanın birkaç bölgesi hariç hemen hemen her bölgesinde Güneybatı Asya'dan Alp Himalaya'lara, Avustralya, pasifik adalarına, Afrika'dan Amerika'ya kadar) farklı rakımlarda ve değişik habitatlarda yetişebilirler. *Nepeta* türleri özellikle Türkiye, İran, Afganistan ve kuzeyde Rusya'da yayılış göstermektedir. *Nepeta* cinsi Türkiye'de genellikle Batı, Güney ve Doğu Anadolu'da yayılış göstermektedir. *Nepeta* türleri 0-

4500 m, çoğunlukla 1000-3000 m’ler arasındaki yükseltilerde hemen hemen her türlü habitatlarda yetişmektedirler (Öz ve Dirmenci 2004).

Türkiye Florasında *Nepeta* 4 alt tür içerir (*nuda*, *glandulifera*, *lydiae*, *albiflora* alttürleri) (Kılıç ve ark. 2011). Genellikle hoş kokulu, tek yıllık veya çok yıllık, ender olarak çalılar ya da ağaçları kapsayan bir çiçekli bitkiler familyasıdır. Dallar sık uzun, enine kesitte dört köşeliden yuvarlağa kadar değişen şekillerde, her tarafı veya karşılıklı iki yüzeyi tüylü. Yaprak ayasının kenarları tamrevolut ya da değil, sapsız ya da kısa saplı, çoğunlukla saptan ayanın kenarlarına doğru sili. Yapraklar, brakteler ve kaliks sapsız salgılı (yağ damlacıklı), salgı renksizden koyu kırmızıya kadar değişir (Davis 1982). Yapraklarındaki küçük salgı bezleri, kokulu yağ salgılamaya yarar. Bundan dolayıkekik, nane ve lavanta çiçeği olmak üzere bu familyaya ait çiçekler bol ıtırılır.

Bu familyanın üyeleri uçucu ve aromatik yağ içerdikleri için, ilaç ve parfüm sanayinde kullanımına başvurulur. Türleri eterik yağ eldesinde kullanılır. Süs bitkisi olarak yetiştirilirler (URL-1 2016). Bu bitkilerin çeşitli metodlarla elde edilen bitkisel ekstreleri ve uçucu yağlarının antimikrobiyal etki gösterdikleri bilinmektedir (Dorman ve Deans 2000, Akgül 1993). Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak insan metabolizması üzerindeki olumlu etkileri sebebiyle fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Pehlivan ve Güleriyüz 2004).

Lamiaceae familyasına ait bitkilerin çoğu alternatif tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmalarının yanı sıra, tıpta, gıda endüstrisinde, parfümeri ve kozmetikte yer alan bitkilerdir. Ayrıca günümüzde rasyonel fitoterapi’de kullanılan pek çok preperatta da bu familya bitkilerinin yer aldığı görülmektedir (Saleem 2000).

Birçok iklim şartlarına adapte olabilen *lydiae* alt türü hakkında çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Türkiye floarası’nın editörü olan Peter Davis 1952’de *Nepeta nuda*’nın dört alttüründen biri olan endemik *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*’yi *Nepeta*’nın alttürü olarak sunmuştur. Daha çok Güneybatı Anadolu’da yayılış gösteren *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*, 600-1700 m yükseklikte *Pinus nigra* ormanı çevresinde, nemli yerler, alpinik step, yol kenarları, akıntı kenarlarında bulunur (Öz Aydın ve Dirmenci 2004).

Çizelge 2.1.*Nepeta nuda* subsp. *lydiae* genel taxon bilgileri.

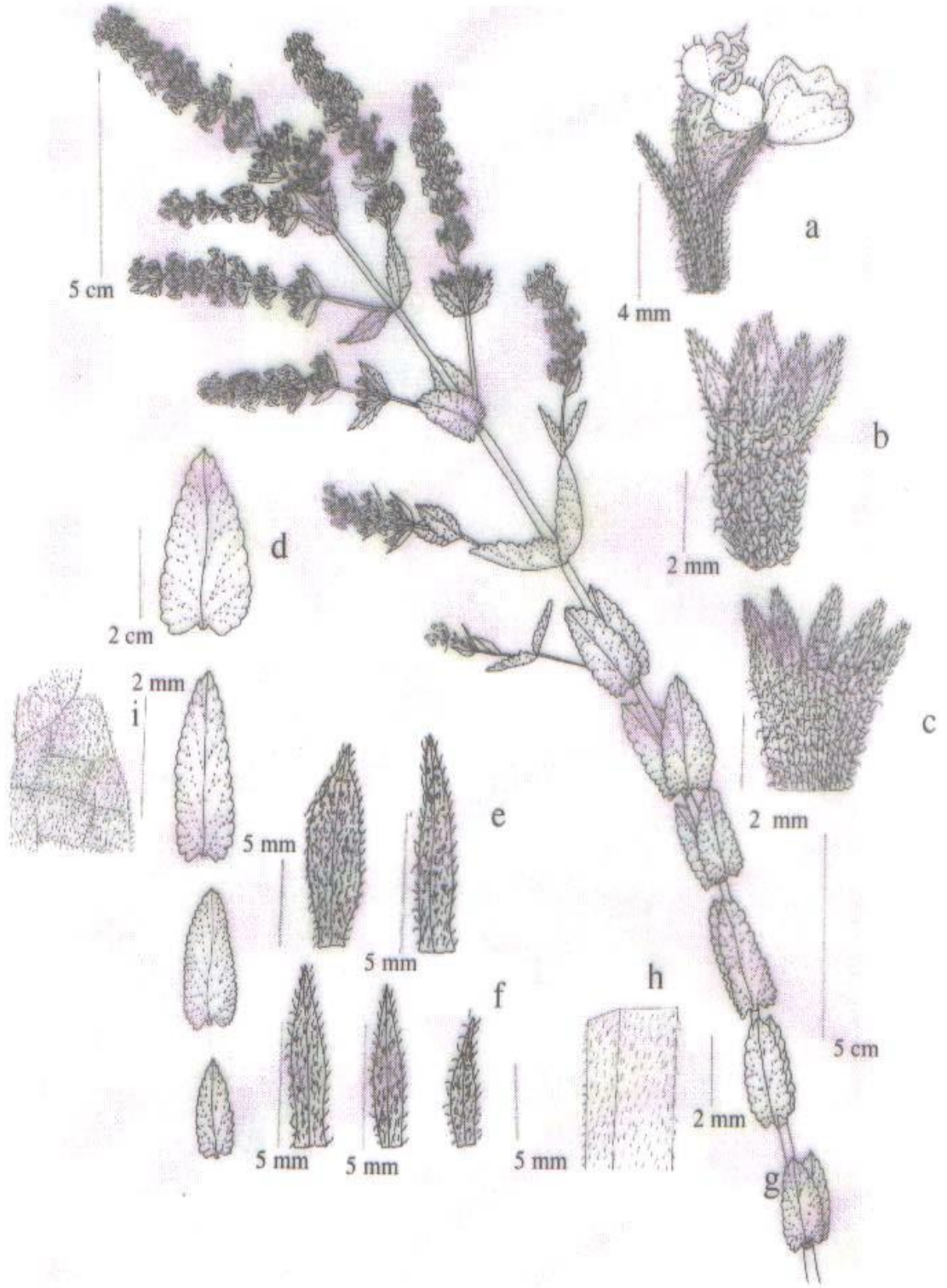
Ömür	: Çok yıllık
Yapı	: ot
Çiçeklenme	: 6-8
Habitat	: Kaya yamaçları
Yükseklik	: 600-1700 m
Endemik	: Endemik
Element	: D. Akdeniz
Türkiye dağılımı	: B. ve GB. Anadolu (Aydın, İzmir, Muğla)
Genel Dağılımı	: Türkiye

Nepeta L. bitki cinsinin farklı türlerinin alternatif halk tıbbında bazı hastalıklara karşı koruyucu, iyileştirici ve antidepresan etkisinin olduğu kabul edilmektedir. Bu amaçla sıklıkla bitkisel çayları tüketilmektedir. Ancak bu tarz bitkilerin zararlı toksit etkileri de bulunabilmektedir. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin sistematığı aşağıda gösterilmiştir.

Alem	:Plantae
Alt alem	:Tracheobionta
şube	:Magnoliophyta
Sınıf	:Magnoliopsida
Alt sınıf	:Asteridae
Takım	:Lamiales
Aile	:Lamiaceae
Cins	: <i>Nepeta</i>
Tr	: <i>Nepeta nuda</i>
Alttür	: <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i>



Şekil 1.5.1.Doğal ortamda *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* fotoğrafı (Foto: Doç. Dr. Ömer KILIÇ)



Şekil 1.5.2. *N. nuda* subsp. *lydiae* P.H. Davis a-çiçek, b-kaliks, c-kaliks dışı, d-yaprak, e-brakte, f-brakteol, g-genel görünüş, h-gövde tüylenmesi, i-yaprak tüylenmesi (Öz ve Dirmenci 2004).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkiler binlerce yıldır doğal ilaç olarak kullanılmaktadır (Balunas ve Kinghorn 2005). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antiseptik özellikleri eski çağlardan beri bilinmesine karşın, ancak 1900’l yılların başında bu özellikleri test etmek için laboratuvar ortamında çalışmalar başlamıştır (Dorman ve Deans 2000). Son yıllarda bitkilerden elde edilen farklı ekstrelere ve bu ekstrelerden elde edilen doğal ürünlere olan ilgi her geçen gün daha da artmaktadır (Kelen ve Tepe 2008). Bitkilerin gövde, yaprak, tohum ve köklerinden birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilecek maddeler izole edilmiştir (Hızlısoy 2009).

Bitkilerin, mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli özellikleri 1926 yılından bu yana araştırılmaktadır (Faydalıoğlu ve Sürücüoğlu 2011). Dünya sağlık rgt (WHO) raporlarına göre; gelişmekte olan ülkelerde yaşayan nüfusun %80’i temel sağlık ihtiyaçları için genelde bitkisel kökenli geleneksel ilaçlara güvenirler. Modern anlamda farmakolojik olarak üretilen ilaçların etken maddelerinin en az %25’i bitkilerden elde edilmektedir. Ayrıca, sentetik olarak üretilen birçok ilacın etken maddeleri de ilk defa bitkilerden izole edilen kimyasalların yapı benzerleridir (Sekar ve Kandavel 2010).

Hastane enfeksiyonlarına neden olan birçok mikroorganizma türünün, tedavi amacıyla kullanılan çoğu antibiyotiğe karşı geliştirdiği direncin artması ile ilaç sektörünün yeni antimikrobiyal maddeler bulması ve bu maddelerin yapılarının araştırılması gerekliliği bitkisel ilaçların bir diğer üstün yanını ortaya çıkar mıştır, böylelikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bitkisel kaynaklı ilaçların kullanımı artış göstermiştir (Sekar ve Kandavel 2010).

Dünya genelinde *Nepeta* bitki familyasının 250’den fazla türü ve 280 civarında cinsi bulunmaktadır. Türkiye’de 33 *Nepeta* türü bulunmakta olup bunların yarısı endemik bitkidir (Kkdil ve ark. 1999). Birçok *Nepeta* türü halk hekimliğinde mantar ve bakteri öldürücü, dem giderici ve dezenfektan olmasının yanı sıra egzama tipi deri hastalıklarına karşı tedavi amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Kılıç ve ark. 2011).

Nepeta’nın, hoş kokulu, uçucu yağlar açısından zengin ve potansiyel ekonomik çıkarı olan birçok çeşidi vardır. Bu eşitler halk hekimliğinde öksürük kesici, kas gevşetici, astım giderici, ateş düşürücü, adet akışını artırıcı, yatıştırıcı ilaç olarak

2. KAYNAK ÖZETLERİ

kullanılır (Kılıç 2013). *Nepeta cataria* bitkisi 17. yüzyıldan beri kuvvetlendirici, dezenfektan, soğuk algınlıklarının tedavisinde halk arasında kullanılagelmiştir. *Nepeta hindostana*'nın alkol ekstresi serum lipid ve protein seviyelerini düşürücü olduğundan arterosklerozise karşı kullanılmaktadır (Yılmaz 2011).

Nepeta cinsi antispazmodik, idrar söktürücü, ateş düşürücü, terletici, antimikrobiyal ve antiseptik madde olarak kullanılmasının yanında kabızlık giderici, dizanteri, diş, böbrek ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Dinesh ve ark. 2010). Terlemeyi sağladığından dolayı *Nepeta*, çoğu kez bitkisel çay gibi tüketilir. Bazı yaş gruplarındaki kişilerde sinirlerinin yatışmasında, ateşlenmelerin önlenmesinde, gribal hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bunlarla beraber ishal, prematüre doğumlar, ağrılı mesane iltihabı ve bazı çocuk hastalıkları tedavisinde ve sabah bulantılarının önlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir (URL-2, 2016).

Bir kısım *Nepeta* türünün, sinirleri yatıştırdığı ve antispazmodik olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra stres, uyku düzensizliği, öksürük, adet krampları ve bağırsak rahatsızlıkları gibi bulguları ortadan kaldırmak için kullanılır (URL 2, 2016). *Nepeta lactonun* birçok türüne karşı haşere kovucu olduğu yapılan son çalışmalarda tespit edilmiştir (Schultz 2004). *Nepeta* türleri halk arasında cilt hastalıklarının tedavisinde, diüretik (idrar sökücü) ve bakteriyostatik etkilerden dolayı kullanılmaktadır. Toprak üstü kısımları, infüzyon halinde (% 2-3) mideyi ve uyarıcı olarak kullanılmaktadır (URL-2, 2016). Todorov ve ark. (2015) *Nepeta nudanın* tıpta potansiyel bir antimikrobiyal kaynağı olabileceğini ileri sürmüşler.

Bunlarla beraber *Nepeta nudanın* bazı bitkilerin fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileride rapor edilmiştir. Bozari ve ark. (2012), *Nepeta nuda* 'danekstrekte edilen esansiyel yağların mısır fidelerinin DNA'sı üzerinde genotoksik etki oluşmasına sebep olduğu ve allelopatinin olası mekanizması, bu genotoksik etki ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bitki Materyali

Çalışmamızda kullandığımız bitki materyali olan *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitki türü 24.06.2013 tarihinde Bingöl ilinde bulunan Dikme yaylası Yelesan köyünün güneyinde 1600-1700 m yüksekliğindeki meşe ağaçlarının oluşturduğu ormanlık alandan Doç. Dr. Ömer KILIÇ tarafından toplanmıştır. Bitkinin türünün teşhisi Flora of Turkey, 7.cilte göre (Davis 1978), Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer KILIÇ tarafından yapılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antioksidan aktivite kapasitesi belirleme için yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerden DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) radikali, ABTS (2,2-Azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) radikali, DMPD ve neokuprin Sigma-Aldrich'ten satın alındı. FeCl₂, NH₄SCN, Na₂HPO₄, K₃Fe (CN)₆, KH₂PO₄, TCA (Trikloroasetik asit), FeCl₃, Tween-20, saf su ve etil alkol Muş Alparslan Üniversitesi merkezi laboratuvarından, fenolik içerik analizinde kullanılan standart fenolik bileşikler Dicle Üniversitesi merkezi araştırma laboratuvarı'ndan, antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılan kimyasal maddeler ve mikroorganizmalar Muş Alparslan Üniversitesi merkezi laboratuvarından temin edildi.

3.1.2.1. Ferrik Tiyosiyanat Aktivite Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. 0.04 M pH:7.4 fosfat tamponu hazırlanması: 1.135 g Na₂HPO₄ alındı 180 ml destile suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 7.4'e ayarlandı. Destile su ile toplam hacmi 200 ml'ye tamamlandı.
2. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 0.017 M'lık linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265 µl linoleik asit 50 ml ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.
3. %3.5'luk HCl çözeltisinin hazırlanması: %37'lik HCl'den 9.46 ml alınarak 100 ml'ye destile suyla tamamlandı.

3. MATERYAL VE METOT

4. 20 mM FeCl₂ çözeltisi hazırlanması: 281 mg FeCl₂.3/4H₂O, %3.5'luk HCl ile çözülerek hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamamlandı.

5. %30'luk NH₄SCN çözeltisinin hazırlanması: 15 g NH₄SCN saf suda çözüldü, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.2.2. Total İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler (FRAP)

1. 0.2 M pH 6.6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6.24 g Na₂HPO₄ yaklaşık 180 ml saf suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'ı 6.6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 ml'ye saf su ile tamamlandı.

2. %1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisinin hazırlanması: 1.5 g K₃Fe (CN)₆ saf suda çözüldü ve toplam hacim 150 ml'ye saf su ile tamamlandı.

3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA saf suda çözüldü ve toplam hacim 150 ml olacak şekilde saf suyla tamamlandı.

4. %0.1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması: 165 mg FeCl₃.6H₂O saf suda çözüldü ve toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

3.1.2.3. Kuprak Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. 0.01 M'lık CuCl₂ çözeltisinin hazırlanması: 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 ml saf suda çözüldü.

2. 7.5x10⁻³ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.

3. 1 M'lık CH₃COONH₄ tamponunun hazırlanması (pH: 6.5): 7.7 g CH₃COONH₄ alındı ve 80 ml saf suda çözüldü, pH-metre ile pH'sı 6.5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

3.1.2.4. DPPH[•] Serbest Radikal Giderme Aktivitesi İle İlgili Çözeltiler

1. 10⁻³ M'lık DPPH[•] çözeltisinin hazırlanması: 39 mg DPPH[•] 100 ml etanolda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

3.1.2.5. ABTS⁺⁺ Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. 0.1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH 7.4): 1.36 g KH₂PO₄ 90 ml saf suda çözündü. pH metre kullanılarak pH'sı 7.4'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 2 mM'lık ABTS çözeltisinin hazırlanması: 11 mg ABTS alınarak 80 ml saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. 2.45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 66.25 mg K₂O₈S₂O₁ M'lık ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
LC (Sıvı Kromatografisi)	: Shimadzu Nexera HPLC, LC-30AD
MS (Kütle Spektrometresi)	: Shimadzu LC-MS 8040
Derin dondurucu	: Sanyo, Japan
pH-metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Scaltec SBA 41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Liyofilizatör	: Labconco
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Evaporatör	: Heidolph 94200, Bioblock Scientific
Saf su cihazı	: Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Stuart Scientific

3. MATERYAL VE METOT

UV-Spektrofotometre küveti : 3 cm³'lük quartz küvet

3.2. Metot

3.2.1. Su Ekstrelerinin Hazırlanması

Antioksidan aktivite ile ilgili çalışmalarda kullanılacak bitki numuneleri gölgede kurutuldu ve parçalayıcı ile toz haline getirildi. Bu numunelerden su ekstresi için 20 gram numuneye üzerlerine 200 ml saf su ilave edilerek 12 saat süresince oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı vasıtasıyla karıştırıldı. Daha sonra çözelti bir süzgeç kâğıdı vasıtasıyla süzüldü. Karışım posası aynı şartlarda yine 100 ml saf su ile ekstrakte edilerek bir süzgeç kâğıdı vasıtasıyla süzüldü. Her iki ekstrenin birleştirilmesinden sonra süzgeç kâğıdı vasıtasıyla süzüldü ve süzüntüler balonlarla derin dondurucuda donduruldu. Dondurulan ekstreler 50 mm-Hg basınç altında liyofilizatör ile kuruluğa kadar liyofilize edildi. Bu numunelerden stok çözelti hazırlamak amacıyla 20 mg liyofilize edilmiş ekstre 20 ml saf suda çözünerek stok çözelti hazırlandı.

3.2.2 Etanol Ekstrelerinin Hazırlanması

Bu numunelerin etanol ekstrelerini hazırlamak için blendır ile parçalanmış 20 gram numunenin üzerine 200 ml etanol eklendi. 12 saat süresince oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra çözelti bir süzgeç kâğıdı vasıtasıyla süzüldü. Karışım posası aynı şartlarda yine 100 ml etanol ile ekstrakte edilerek bir süzgeç kâğıdı vasıtasıyla süzüldü. Ekstreler birleştirildikten sonra süzgeç kâğıdından süzülerek, süzüntüler balonlara alındı ve derin dondurucuda donduruldu. Derin dondurucudan ekstreler çıkarılarak evaporatörde çözücü uzaklaştırıldı. Bu numunelerden stok çözelti hazırlandı. Bu amaçla 20 mg ekstre 20 ml etanolde çözünerek stok çözelti hazırlandı.

3.2.3. FRAP Yöntemi İle İndirgeme Kapasitesi

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstrelerinin total indirgeme kuvveti tayini Oyaizu (1986) yönteminde bazı değişiklikler uygulayarak yapıldı. Stok çözeltiden farklı konsantrasyonlardan belirli miktarlarda alınarak deney tüplerine aktarıldı. Destile suyla hacmi 1 ml'ye tamamlandı. Sonra her bir deney tüpüne 2.5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] ve PH'sı 6.6 olan 2.5 ml 0.2 M fosfat

tamponu ilave edildi ve karışım 50°C’de 20 dk. boyunca inkbasyonabırakıldı. Bu işlemlerin ardından 2.5 ml %10’luk triklorasetik asit (TCA) reaksiyon karışımına ilave edildi. Çözeltinin st fazından 2.5 ml alındı ve bunun üzerine %0.1’lik 0.5 ml FeCl₃ve 2.5 ml destile su ilave edildildikten sonra 700 nm’de absorbands ölçüldü. Destile su kr olarak kullanıldı. Kontrol olarakta su kullanıldı (Ak 2008).

3.2.4. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin DPPH[•] radikali giderme aktivitesi Blois metodunda (1958)bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (Bursal ve Koksall 2011). Serbest radikal olarak DPPH[•]’ın 1 mM’lık zltisi kullanıldı. Numune olarak diğer aktivite metotlarında kullanılmış olan 1 mg/ml konsantrasyonda stok zltisi kullanılarak yapıldı. Farklı konsantrasyonlardaki stok zltiler deney tüplerine alındı ve toplam hacimleri etil alkol ile 3 ml’ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe stok DPPH[•] zltisinden 1’er mleklenildi ve oda sıcaklığında ve karanlıkta30 dakika inkübe edilerek 517 nm’ krde absorbands ölçüldü. Kr olarak etanol,kontrol olarakta 1 ml DPPH[•] zltisi ve 3 ml etanol kullanıldı. Azalan absorbands geriye kalan DPPH[•] zltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir.

3.2.5. ABTS (2,2-Azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) Radikali Giderme Aktivitesi

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstrelerinin ABTS^{••} radikali giderme aktivitesi Re ve ark. (1999) yaptığı çalışmada bazı değişiklikler uygulayarak yapıldı (Bursal ve ark., 2013). Öncelikle 3.5 mM’lık ABTS zltisi hazırlandı. Bu zltiye 2.45 mM’lık persülfat zltisi eklenerek ABTS^{••} radikalleri retilildi. ABTS^{••} radikal zltisi kullanılmadan önce kontrol zltisinin 734 nm’de absorbandsı 0.1 M ve pH’sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.750 nm - 0,800 nm aralığında bir değere ayarlandı. ABTS^{••} radikal giderme aktivitesine bakılan *Nepeta nuda* L.subsp. *lydiae* bitkisinin farklı konsantrasyonlarına birer ml ABTS^{••} radikal zltisi eklenerek ve 30 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm’de absorbandslar kaydedildi.

3.2.6. KUPRAK Yöntemi İle İndirgeme Kapasitesi

Nepeta nuda subsp. *lydiae* liyofilize su ekstresinin kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının kullandığı Kuprak (2007) metoduna göre yapıldı. Bunu için deney tüplerine 0.01 M'lık 0.25 ml CuCl_2 çözeltisi ilave edildi. Bunun üzerine 0.25 ml 7.5×10^{-3} M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 1 M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10–30 $\mu\text{g/ml}$) *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin ekstreleri veya standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini gösterir.

3.2.7. Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metodunda (Mitsuda ve ark. 1966) bazı değişiklikler yapılarak belirlendi (Gülçin ve ark 2011). Öncelikle 1 mg/ml konsantrasyonunda stok çözeltiler hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda stok çözeltiler, vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2.5 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2.5 ml linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2.5 ml tampon çözelti ve 2.5 ml linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. Inkübasyon 37°C 'de gerçekleştirildi. Her on saatte bir defa vezin kaplarından 100'er μl alındı 4.7 ml etanol bulunan deney tüplerine konuldu 100 μl Fe^{2+} çözeltisi daha sonra da 100 μl SCN $^-$ çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 4.8 ml etanol bulunan deney tüpüne 100 μl Fe^{2+} ve 100 μl SCN $^-$ çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin peroksit seviyeleri 500 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi.

3.2.8. LC-MS /MS İle Fenolik İçerik Analizi

3.2.8.1. Test Çözeltisi Olan Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 100 g numune oda sıcaklığında 3 defa 300 ml metanol ile 24 saat boyunca ekstrakte edildi. Çözücü rotary evaporator ile 30°C 'de, kurumetanolekstreleri (% 15.6 verim) elde edilene kadar uzaklaştırıldı. Kurufiltreler 1000 mg/L'ye seyreltildi ve LC-MS / MS analizi için 0.2 μm mikrofiber filtre ile filtre edildi.

3.2.8.2. Cihazlar ve LC-MS/MS İçin Kromatografik Koşullar

LC-MS/ MS ile fenolik bileşiklerin analizi, ikili MS cihazı bağlanmış bir Nexera modeli Shimadzu HPLC kullanılarak yapıldı. Sıvı kromatografisi LC-30AD ikili pompa, DGU-20A3R degazör, KTO-10AS vp kolon fırını ve SIL-30AC otomatik örnekleyici ile donatılmıştır. Kromatografik ayırma, C18 ters-faz analitik kolonu Inertsil ODS-4 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) ile gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C'de sabit tutuldu. Elüsyon gradienti mobil faz A (su, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ile oluşturuldu. Gradient programı B çözücüsünün aşağıdaki değerlerine göre t (dk) uygulanmıştır. B%: (0.40), (20.90), (23.99, 90), (24.40), (29.40). Çözücü akış hızı 0.5 ml/dk olarak uygulandı ve enjeksiyon hacmi 4 µL olarak ayarlandı.

3.2.8.3. MS Cihazlandırılması

MS tespiti Shimadzu LC-MS8040 modeli üçlü, dört kutuplu ve hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında ESI kaynağı ile donatılmış kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı. LC-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile elde edilerek hesaplamalar yapıldı. Çoklu reaksiyon takip işlemi (MRM) modu analizi ölçmek için kullanıldı. Deneyde her bir bileşik analizi için iki veya üç kez uygulama yapıldı. Birinci kantitatif sonuçlar için ikinci ve üçüncü analizler ise teyit için yapıldı. Optimum ESI parametreleri; 350°C ara yüz sıcaklığı, 250°C DL sıcaklığı, 400°C ısı bloğu sıcaklığı, 3L/dak. Nebülizergaz akışı (azot) ve 15 L/dak. kurutucu gaz akışı (azot) olarak belirlendi (Ertaş ve ark. 2015).

3.2.9. Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi

Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yönteminden yararlanılarak ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi. Disk Difüzyon Yöntemi aynı zamanda Kirby Bauer Yöntemi olarak da bilinir ve antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılmaktadır (Kıvçak ve ark. 2002).

Bu çalışmada, ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri American Type Culture Collection (ATCC) standart kalite kontrol mikroorganizmaları 3 çeşit Gram pozitif bakteri (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus*

3. MATERYAL VE METOT

megaterium DSM 32), 4 çeşit Gram negatif bakteri (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) ve 3 mantar türü (*Candida albicans* ATCC 10231, *Yarrowia lipolytica* ve *Saccharomyces cerevisiae*) üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca ek olarak, eritromisin (E-15), Ampisilin / sulbaktam (SAM- 20), amikasin (AK-30) ve rifampisin (RD-5) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Her ekstraktan 30 µl, 60 µl ve 90 µl alınarak 8 mm çapında olan steril diske absorbe edildi. Deney için, 10^6 - 10^7 cfu/ml süspansiyondan her organizmadan %1 oranında alınarak 15 ml steril ortama agar plaklara ekildi. Bagetle yayıldı. Kuruduktan sonra diskler yerleştirildi. 24-48 saat 37 °C’de inkübe edildi (Muller-Hintone agar bakteri için, Sabourand dextros agar mantar için).

Dört standart antibiyotik diski pozitif kontrol olarak kullanıldı. Hassasiyet Eritromisin (E-15), Ampisilin / sulbaktam (SAM- 20), amikasin (AK-30) ve rifampisin (RD-5) tarafından oluşturulan önleyici alan çapları ile karşılaştırılarak sonuca ulaşıldı.

27 °C’de inkübe edilen *Candida albicans* ATCC 10231, *Yarrowia lipolytica* ve *Saccharomyces cerevisiae* dışındaki petri kapları 37 °C de 24-48 saat boyunca inkübe edildi. İnhibisyon zonları ölçüldü ve 3 mm tekrarlamalı ortalama çap olarak kaydedildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

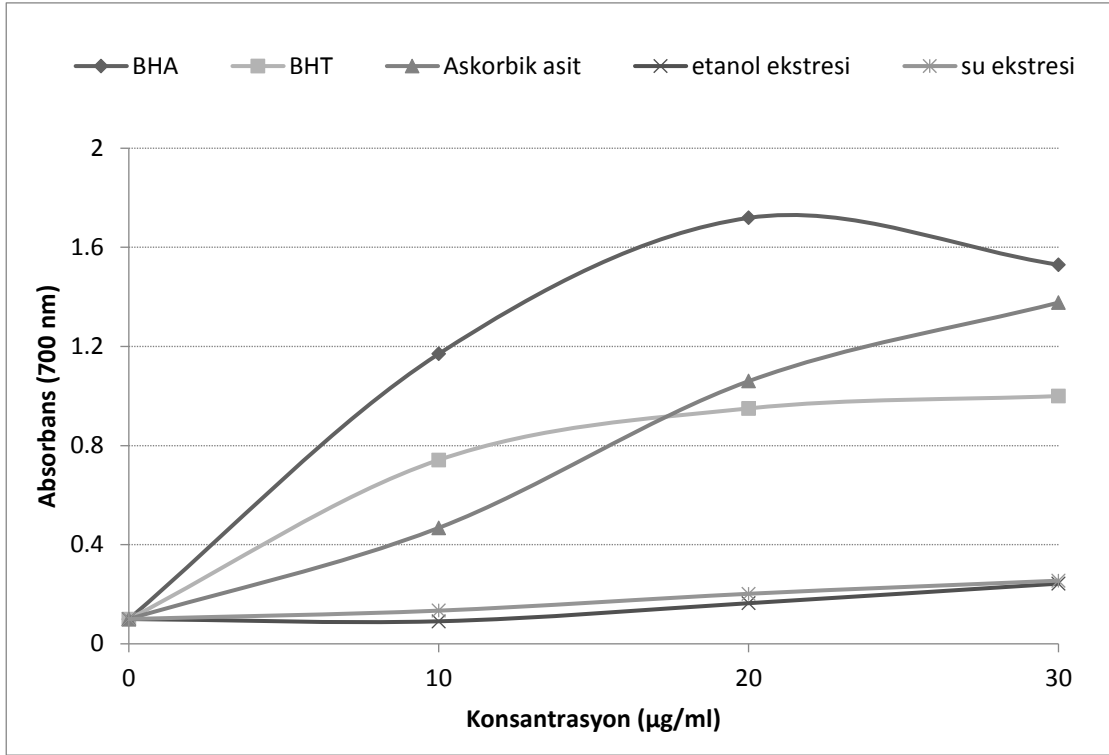
Antioksidan kapasitesilm yöntemleri; gıda, beslenme ve farmakolojide kullanılan bitki çeşitlerinin ve bu bitkilerden elde edilen biyolojik muhtevelyatların biyolojik etki kabiliyetlerinin aydınlatılması açısından yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla serbestradikal giderme aktivitesi, metal elat oluşumu ve indirgeme kapasitelerinin araştırılması gibi yöntemler sıkça kullanılmaktadır (Bursal 2009). Mevcut çalışmada da bu metotlardan ABTS (2,2-Azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik Asit) radikalı giderme aktivitesi, Ferrik tiyosiyanat yöntemine göre toplam antioksidan aktivite tayini, CUPRAC metoduna göre indirgeme kuvveti tayini, DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) serbest radikalı giderme aktivitesi ve FRAP (demir indirgeme kapasitesi) metotları kullanıldı. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstrelerinin bulguları ile antioksidan özellikleri bilinen standart antioksidanlardan askorbik asit, BHA ve BHTsonuları karılatırılarak şekillerde grafikleri çizilerek gösterildi.

4.1. FRAP Yöntemi ile İndirgeme Kapasitesi ile İlgili alıma Bulguları

Antioksidan kapasite tayini için kullandığımız bu yöntemde, test çözeltisinin renginin ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme özellikleri nedeniyle kompleks oluşturması neticesinde değişik tonlardaki yeşil rengine dönüşmesi ve spektrofotometre ile absorbans ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Bursal ve ark. 2013).

Bulgulardan da anlaşıldığı gibi BHA, BHT ve askorbik asit benzer indirgeme kapasitesi sergilemiştir. BHA diğer standart antioksidanlara göre daha etkin bir indigeme kapasitesi sergilemiştir. Buna göre 30 µg/mL konsantrasyonunda Fe⁺² iyonlarını indirgeme kapasitelerinin sıralamasıBHA> askorbik asit>BHT> *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* su ekstresi> *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* etanol ekstresi şeklindedir.

4. ARASTIRMA BULGULARI



Şekil 4.1. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) FRAP yöntemi indirgeme aktivitelerinin BHA, BHT ve askorbik asit antioksidan standartları ile karşılaştırması

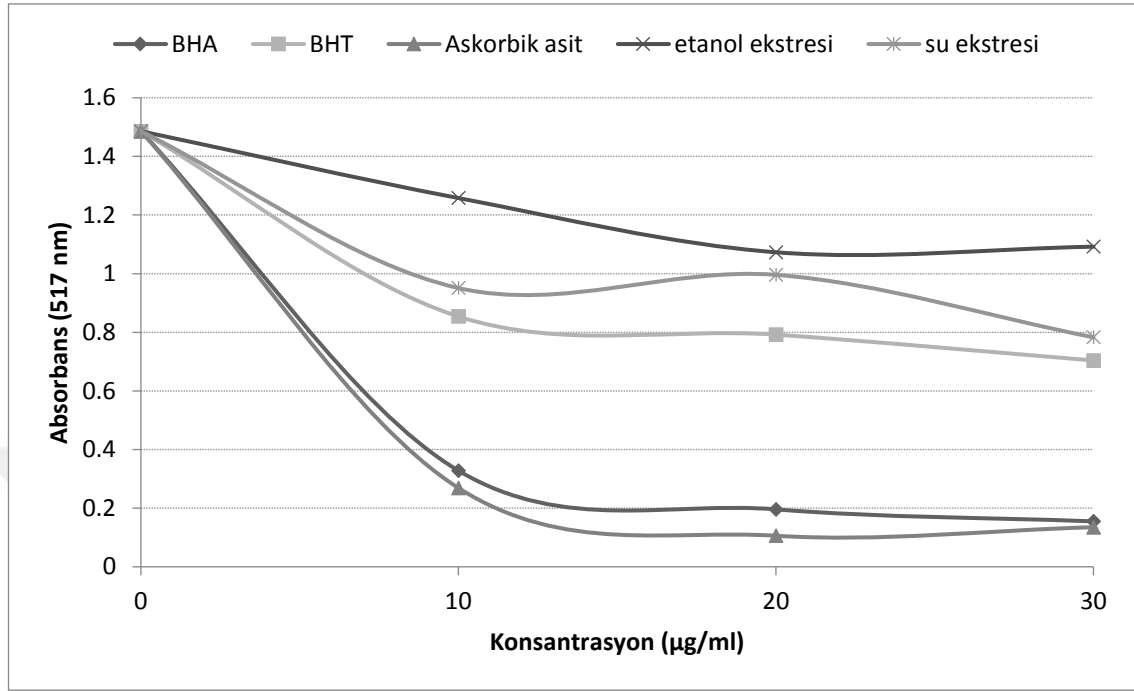
Çalışmada analiz edilen *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstralarının indirgeme kapasitesi standart birer antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit gibi artan ekstre konsantrasyonu ile paralel olarak artmakta fakat artış miktarlarının nisbeten az olduğu grafikten anlaşılmaktadır. Ekstrelerin indirgeme kapasitesindeğişik konsantrasyonlarda (10–30 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm’de köre karşı absorbansları okunarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).

4.2. DPPH•Radikali Giderme Kapasitesi İle İlgili Çalışma Bulguları

DPPH• radikali giderme kapasitesiyle alakalı yapılmış çalışmalarda 517 nm’de azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstralarının standart antioksidanlar benzer DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediği Şekil 4.2’deki bulgulardan açık bir şekilde görülmektedir.

Bulgulardan da anlaşıldığı gibi BHA, BHT ve askorbik asit benzer indirgeme kapasitesi sergilemiştir. 30 µg/mL konsantrasyonunda DPPH• indirgeme kapasitelerinin

sıralaması askorbik asit> BHA> BHT> *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* su ekstresi> *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* etanol ekstresi şeklindedir.



Şekil 4.2. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin antimikrobiyal etkisinin standart antibiyotiklerle karşılaştırılması

DPPH• radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki denkleme göre yapıldı. Burada A_{Numune} DPPH• radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $A_{Kontrol}$ ise sadece DPPH• radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT ve askorbik asit kullanıldı.

$$\text{DPPH} \bullet \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{Numune}}{A_{Kontrol}} \right) \times 100$$

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstraktları ile standart antioksidanlar 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla askorbik asit (%90.9)> BHA (%89.5)> BHT (%52.6)> su ekstresi (%48.9)> etanol ekstresi (%28.7) şeklinde DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca DPPH radikal gidermesi için IC_{50} değerleri (radikallerin %50'sini giderecek numune konsantrasyonu) hesaplandı. Buna göre etanol ekstresi için 52.3 µg/mL ve su ekstresi için 30.7 µg/mL IC_{50} değerleri bulundu. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi su ekstresinin DPPH• radikali

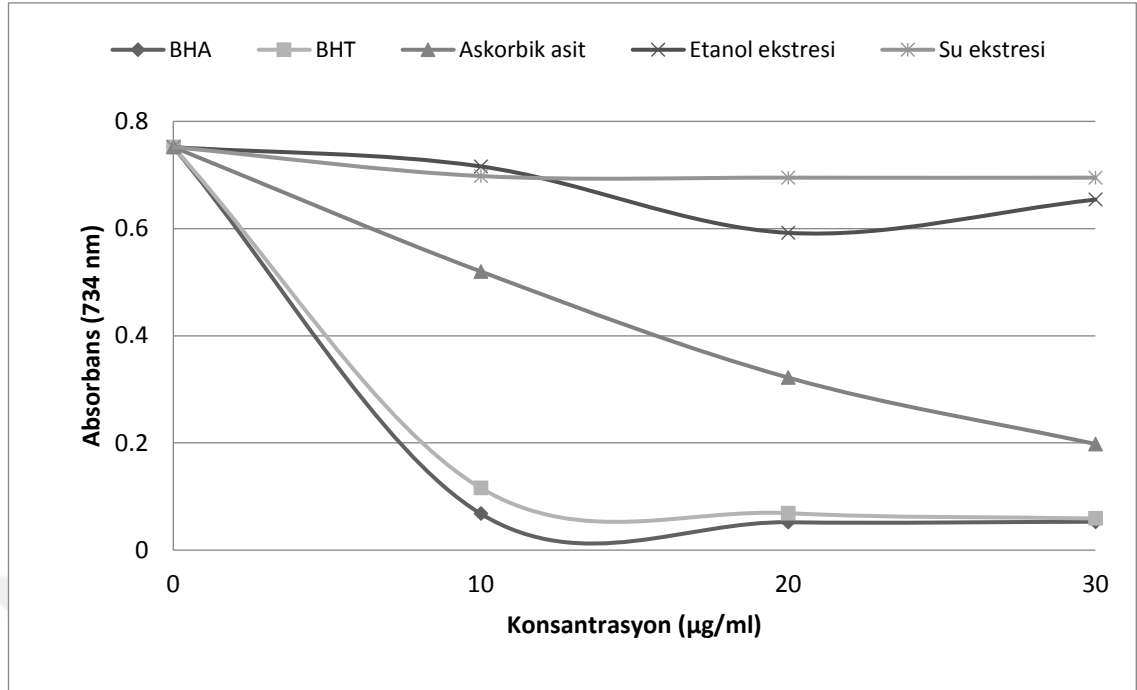
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

giderme aktivitesi askorbik asit ve BHA'dan nisbeten daha az BHT'ye yakın miktarda olduğu çalışma bulgularından elde edilmiştir.

4.3. ABTS^{•+}Giderme Aktivitesi Bulguları

ABTS^{•+} giderme aktivitesi de sıklıkla kullanılan radikal giderme tayin metotlarından biridir. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS^{•+} giderme aktivitesi de bitki ekstraktlarının veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılan bir tayin metodudur (Miller 1996; Bursal 2009). Bunun için öncelikle ABTS maddesinden radikal formu olan ABTS^{•+}'nin oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0.1 M, pH 7.4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiye 2.45 mM'lık potasyum persülfat ilave edildi. Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı. Manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki kontrol numunesinin absorbans değeri 0.750 ± 0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi ve numunelerin ölçümleri yapıldı (Gülçin 2007).

Bulgulardan da anlaşıldığı gibi BHA, BHT ve askorbik asit benzer indirgeme kapasitesi sergilemiştir. 30 µg/ml konsantrasyonunda ABTS^{•+} indirgeme kapasitelerinin sıralaması BHA (%92.9) > BHT (%92.1) > askorbik asit (%73.7) > *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* etanol ekstresi (%13) > *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* su ekstresi (% 2.4) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstralarının farklı derişimlerde (10-30 µg/ml) ABTS⁺⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan askorbik asit, BHA, BHT ile karşılaştırılması

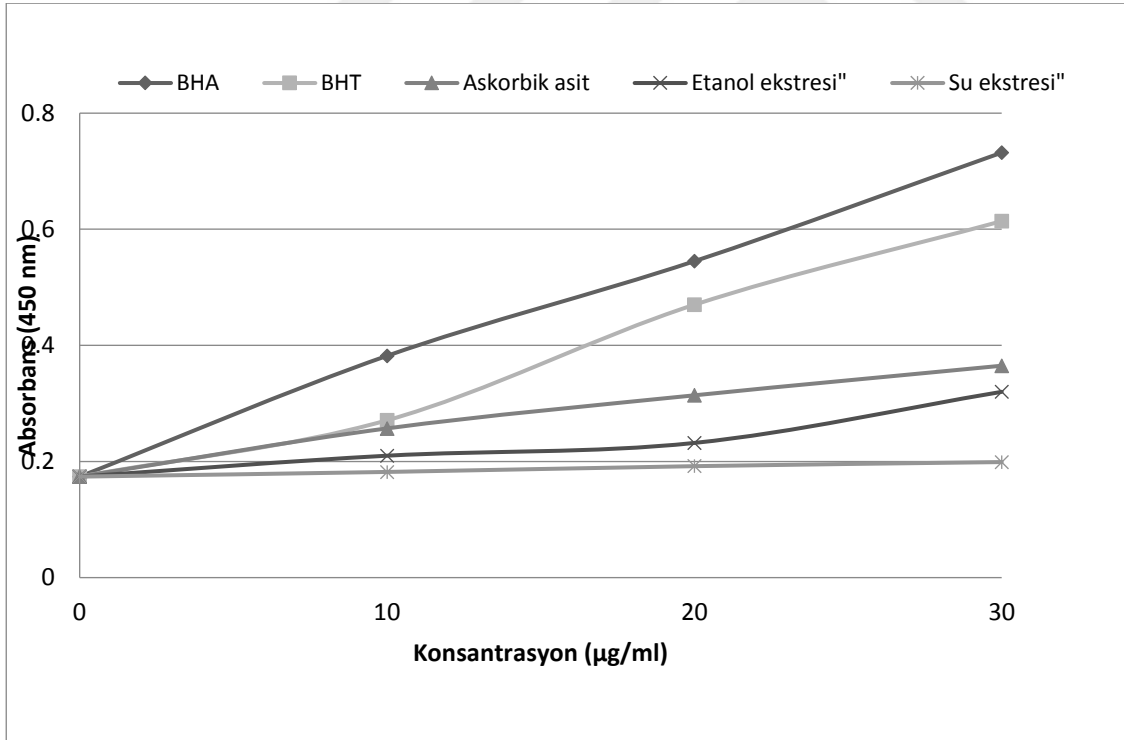
Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstralarının standart antioksidanlara göre daha az ABTS⁺⁺ radikali giderme aktivitesi sergilediği Şekil 4.3. deki bulgulardan açık bir şekilde görülmektedir.

Çizelge 4.1. Standart antioksidanların ve *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*'nin radikal giderme IC₅₀ değerleri.

	DPPH radikal giderme	ABTS radikal giderme
BHA	16.8 µg/mL	16.1 µg/mL
BHT	28.5 µg/mL	16.3 µg/mL
Askorbik asit	16.5 µg/mL	20.4 µg/mL
Etanol ekstresi	52.3 µg/mL	115.4 µg/mL
Su ekstresi	30.7 µg/mL	625.0 µg/mL

4.4. Kuprak Metoduna Göre İndirgeme Kuvveti Tayini Bulguları

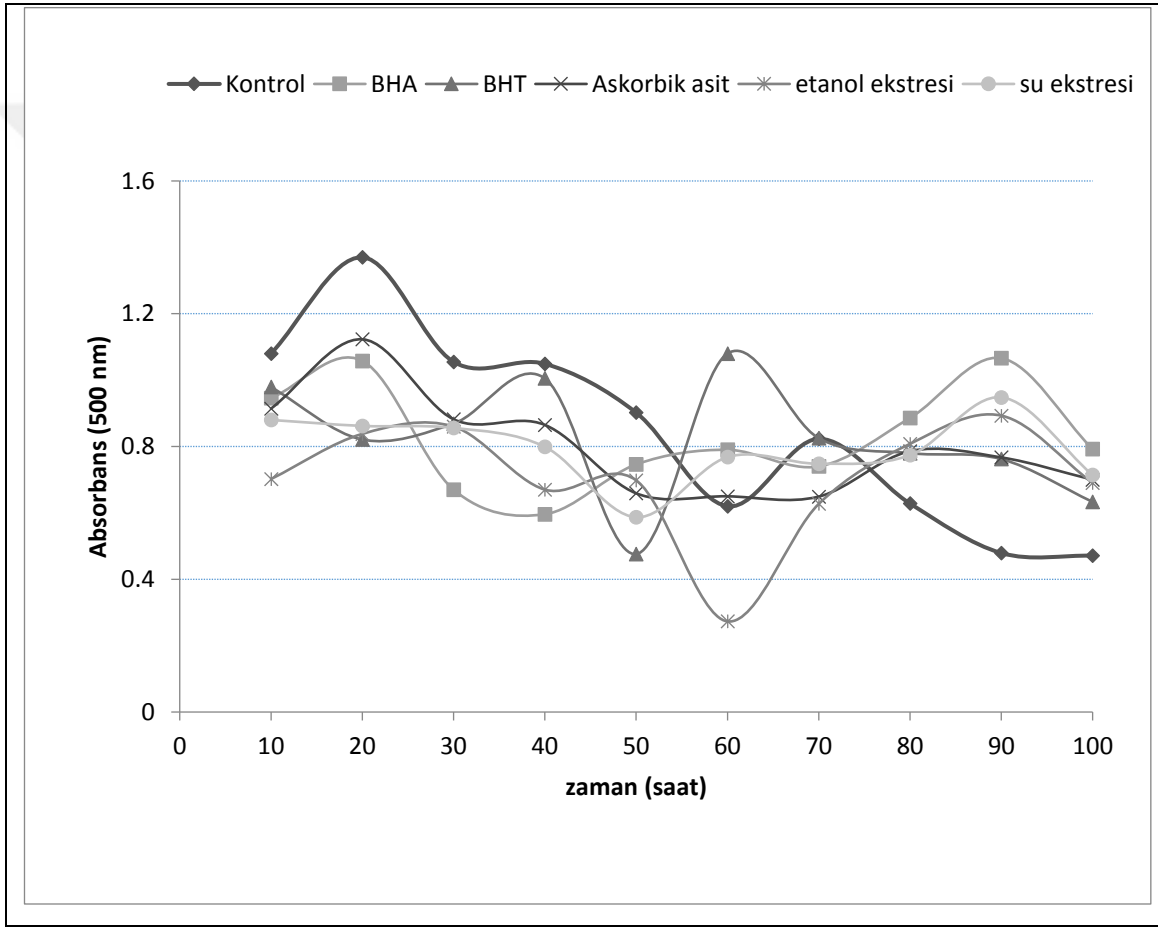
Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi liyofilize su ekstresinin kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi Apak ve arkadaşlarının kullandığı Kuprak metodunun (2006) farklı bir versiyonuna göre yapıldı (Bursal ve Gülçin 2011). Bunu için deney tüplerine 0.01 M'lık 0.25 ml CuCl_2 çözeltisi ilave edildi. Bunun üzerine 0.25 ml 7.5×10^{-3} M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 1 M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10–30 $\mu\text{g/ml}$) *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi ekstraktları ve standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini göstermektedir. Bulgulardan da anlaşıldığı gibi BHA, BHT ve askorbik asit benzer indirgeme kapasitesi sergilemiştir. 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda kuprik iyonlarını (Cu^{2+}), kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitelerinin sıralaması BHA > BHT > askorbik asit > *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* etanolekstresi > *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* su ekstresi şeklindedir.



Şekil 4.4. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/ml}$) Kuprak yöntemi indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve askorbik asit ile karşılaştırması

4.5.Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları

Çalışmada kullandığımız *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinden temin edilen su ve etanol ekstrelerinin antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat aktivite tayin metoduna göre belirlendi. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* elde edilen su ve etanol ekstrelerinin toplam antioksidan aktivite tayini için sırasıyla 20 µg/ml konsantrasyonlarındaki numuneler kullanıldı. şekil 4.5'te *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstrelerinin toplam antioksidan aktivitesi grafiği verilmiştir.



şekil 4.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Bu metoda göre linolenik asit, Tween-20 ve fosfat tamponu ile oluşturulan emülsiyon çözeltisinde bulunan doymamış bir yağ asidi olan linolenik asidin oda sıcaklığında inkübasyonunda oluşan lipid peroksidin miktarının ölçümüne dayanmaktadır. Yüksek absorbans düşük antioksidan aktiviteyi, düşük absorbans ise

4. ARASTIRMA BULGULARI

yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir. Ortamda bir antioksidan maddenin varlığında lipid peroksit ürünü oluşmaz ve konsantrasyonu dolayısıyla absorbansı düşük çıkar (Ak ve Gülçin 2008).

Kullanılan standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunu inhibe etme yüzdeleri ellinci saat temel alınarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{Lipit peroksidasyon inhibisyonu (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100$$

Burada A_{Numune} farklı konsantrasyonlardaki ekstre değerlerinin maksimumuna ulaştığı inkübasyon anındaki absorbans değeri, A_{Kontrol} ise kontrol değerinin maksimumuna ulaştığı inkübasyon anındaki absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol askorbik asit, BHA ve BHT kullanıldı. Şekil 4.5'te okunan absorbans değerleri grafiğe yansıtılmıştır. Bu absorbans değerlerinin verilen eşitlikte kullanılması ile elde edilen çalışma verilerine göre lipit peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri BHT (%47.2), su ekstresi (%34.9), askorbik asit (%26.9), etanol ekstresi (% 22.6) ve BHA (% 17.3) olarak hesaplanmıştır. Bu verilere göre *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* su ve etanol ekstreleri diğer standart antioksidanlar gibi linoleik asit peroksidasyonunu gerçekleştirmiştir. Ancak bu metodun kontrol ve standart antioksidanların sonuçları anlamlı bulunmamıştır. Kontrol numunesi için belli bir zamana kadar absorbans artışı gözlenmesi ve bu noktadan sonra azalma gözlenmesi beklenmektedir. Ancak beklenen şekilde veriler elde edilmemiş olup tekrar çalışmalarda da aynı durum gözlenmiştir. İleriki çalışmalar ile bu metodun mekanizması aydınlatılmalıdır.

4.6. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

İnsan sağlığına zarar veren birçok mikroorganizma yetersiz antibiyotik kullanımından dolayı ilaç direnci göstermektedir. Bu nedenle, bitkiler dahil doğal kaynaklardan elde edilecek yeni maddelerin keşfedilmesine ihtiyaç vardır. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* ekstresinin disk difüzyon yöntemi ile in vitro antimikrobiyal aktivitesinin patojen mikroorganizmalara karşı gösterdiği etki Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin antimikrobiyal özelliğinin standart antibiyotiklerle karşılaştırılması

Mikroorganizmalar		ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE (mm)							
		<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>lydiae</i> (20 mg/ml Etanol)			Antibiyotik disk				
		30 µl	60 µl	90 µl	Eritromisin	Ampisilin/sulbaktam	Amikasin	Rifampisin	Fluconazole
Gram Pozitif	<i>B. subtilis</i>	-	-	10±0.47	20±1.24	14±0.47	11±1.24	21±1.24	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	21±0.00	10±0.81	9±0.00	18±1.69	-
	<i>B. megaterium</i>	10±0.00	12±0.00	13±0.47	25±1.69	-	10±0.81	16±1.24	-
Gram negatif	<i>E. aerogenes</i>	10±0.47	11±0.00	12±1.24	27±1.24	10±0.47	9±0.00	16±0.47	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-	19±0.00	13±1.24	13±0.81	18±1.24	-
	<i>P. aeruginosa</i>	9±0.00	10±0.81	11±1.24	19±1.69	-	14±0.00	8±0.00	-
	<i>K. pneumoniae</i>	9±0.00	10±0.00	10±0.00	19±0.47	16±1.69	10±0.47	19±1.69	-
Mantar	<i>Y. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	21
	<i>C. albicans</i>	10±0.81	13±1.24	17±1.69	-	-	-	-	23
	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Bu çalışmada, *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* ekstresi *B. Megaterium* (13±0.47 mm inhibisyon zonu)'a karşı en yüksek antibakteriyel aktivite sergilerken en düşük etkisini *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'ye karşı sergilemiştir. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* ekstresi *C. albicans* (17±1.69 mm inhibisyon zonu)'a karşı yüksek antifungal aktivite gösterirken *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae*'a karşı herhangi bir etki göstermemiştir.

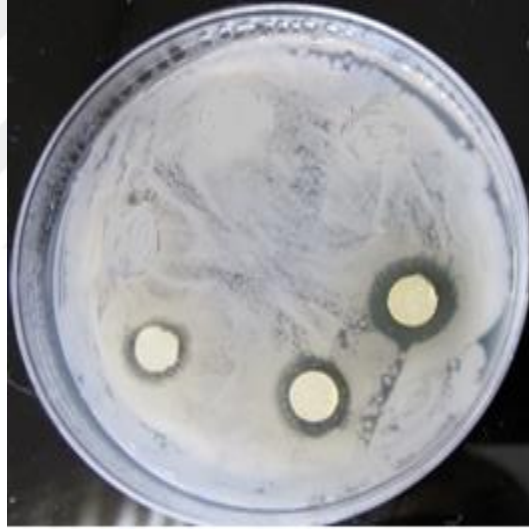
4. ARASTIRMA BULGULARI

Bitki, antimikrobiyal etkisi, dünyanın farklı bölgelerinde gerçekleştirilen çeşitli araştırmalarda bir bitkiden başka bir bitkiye değiştiği gözlemlenmiştir. Bu; kalite, miktar, ekstre ürünü bileşimi, iklim, toprak bileşimi, yaş, bitki döngüsü aşaması, farklı bakteri türleri etkisi gibi birçok faktöre bağlı olabilir (Masotti ve ark. 2003, Angioni 2006).

Örneklerin antibakteriyel aktivite derecesi de numune konsantrasyonundaki artış ile değişebilir. Kabaca, örneklerin konsantrasyonları 30 µl, 60 µl ve 90 µl artırıldığı zaman, 1-2 mm artış gözlemlenmiştir. *Nepata nuda* subsp. *lydiae*'nin antibakterial aktiviteleride referans antibiyotiklerle karşılaştırıldı. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi, ekstreler Ampisilin/sulbaktam (SAM- 20 mg) ve Amikasin (AK-30 mg) ile benzer oranda, fakat Eritromisin (E-15 mg) ve Rifampisin(RD-5 mg)'den daha düşük aktivite sergiledi.



Şekil 4.6.1. *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883-subsp. *lydiae*



Şekil4.6.2. *Bacillus megaterium* DSM 32 -subsp. *lydiae*



Şekil4.6.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027– subsp.



Şekil4.6.4. *Escherichia coli* ATCC 11229-subsp. *lydiae*



Şekil4.6.5. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923-subsp. *lydiae*



Şekil4.6.6. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048-subsp. *lydiae*

4.7.LC-MS /MS İle Fenolik İçerik Analizi Bulguları

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi etanol ekstresinin fenolik içeriğinin belirlenmesi LC-MS/MS analiz metoduna göre yapıldı. Standart olarak alınan 27 farklı fenolik bileşiiğın LC-MS/MS parametreleri ile ilgili bilgiler aşığıdaki izelge 4.3’de verilmiştir.

4. ARASTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.3. Standart olarak alınan fenolik bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri

^aRT: Retention time

^pparent ion (*m/z*): Molecular ions of the standard compounds (mass to charge ratio)

No	Analytes	RT ^a	Parent ion(<i>m/z</i>) ^b	Ionization Mode	R ^{2c}	RSD% ^d	Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Recovery (%)	U ^f
1	Quinic acid	3.32	190.95	Neg	0.9927	0.0388	250-10000	22.3 / 74.5	103.3	4.8
2	Malic acid	3.54	133.05	Neg	0.9975	0.1214	250-10000	19.2 / 64.1	101.4	5.3
3	tr-Aconitic acid	4.13	172.85	Neg	0.9933	0.3908	250-10000	15.6 / 51.9	102.8	4.9
4	Gallic acid	4.29	169.05	Neg	0.9901	0.4734	25-1000	4.8 / 15.9	102.3	5.1
5	Chlorogenic acid	5.43	353	Neg	0.9932	0.1882	250-10000	7.3 / 24.3	99.7	4.9
6	Protocatechuic acid	5.63	152.95	Neg	0.9991	0.5958	100-4000	25.8 / 85.9	100.2	5.1
7	Tannic acid	6.46	182.95	Neg	0.9955	0.9075	100-4000	10.2 / 34.2	97.8	5.1
8	tr- caffeic acid	7.37	178.95	Neg	0.9942	1.0080	25-1000	4.4 / 14.7	98.6	5.2
9	Vanillin	8.77	151.05	Neg	0.9995	0.4094	250-10000	10.1 / 33.7	99.2	4.9
10	p-Coumaric acid	9.53	162.95	Neg	0.9909	1.1358	100-4000	15.2 / 50.8	98.4	5.1
11	Rosmarinic acid	9.57	358.9	Neg	0.9992	0.5220	250-10000	10.4 / 34.8	101.7	4.9
12	Rutin	10.18	609.1	Neg	0.9971	0.8146	250-10000	17.0 / 56.6	102.2	5.0
13	Hesperidin	9.69	611.1	Poz	0.9973	0.1363	250-10000	21.6 / 71.9	100.2	4.9
14	Hyperoside	10.43	463.1	Neg	0.9549	0.2135	100-4000	12.4 / 41.4	98.5	4.9
15	4-OH Benzoic acid	11.72	136.95	Neg	0.9925	1.4013	25-1000	3.0 / 10.0	106.2	5.2
16	Salicylic acid	11.72	136.95	Neg	0.9904	0.6619	25-1000	4 / 13.3	106.2	5.0
17	Myricetin	11.94	317	Neg	0.9991	2.8247	100-4000	9.9 / 32.9	106.0	5.9
18	Fisetin	12.61	284.95	Neg	0.9988	2.4262	100-4000	10.7 / 35.6	96.9	5.5
19	Coumarin	12.52	146.95	Poz	0.9924	0.4203	100-4000	9.1 / 30.4	104.4	4.9
20	Quercetin	14.48	300.9	Neg	0.9995	4.3149	25-1000	2.0 / 6.8	98.9	7.1
21	Naringenin	14.66	270.95	Neg	0.9956	2.0200	25-1000	2.6 / 8.8	97.0	5.5

22	Hesperetin	15.29	300.95	Neg	0.9961	1.0164	25-1000	3.3/ 11.0	102.4	5.3
23	Luteolin	15.43	284.95	Neg	0.9992	3.9487	25-1000	5.8 / 19.4	105.4	6.9
24	Kaempferol	15.43	284.95	Neg	0.9917	0.5885	25-1000	2.0 / 6.6	99.1	5.2
25	Apigenin	17.31	268.95	Neg	0.9954	0.6782	25-1000	0.1 / 0.3	98.9	5.3
26	Rhamnetin	18.94	314.95	Neg	0.9994	2.5678	25-1000	0.2 / 0.7	100.8	6.1
27	Chrysin	21.18	253	Neg	0.9965	1.5530	25-1000	0.05 / 0.17	102.2	5.3

^cR²: coefficient of determination

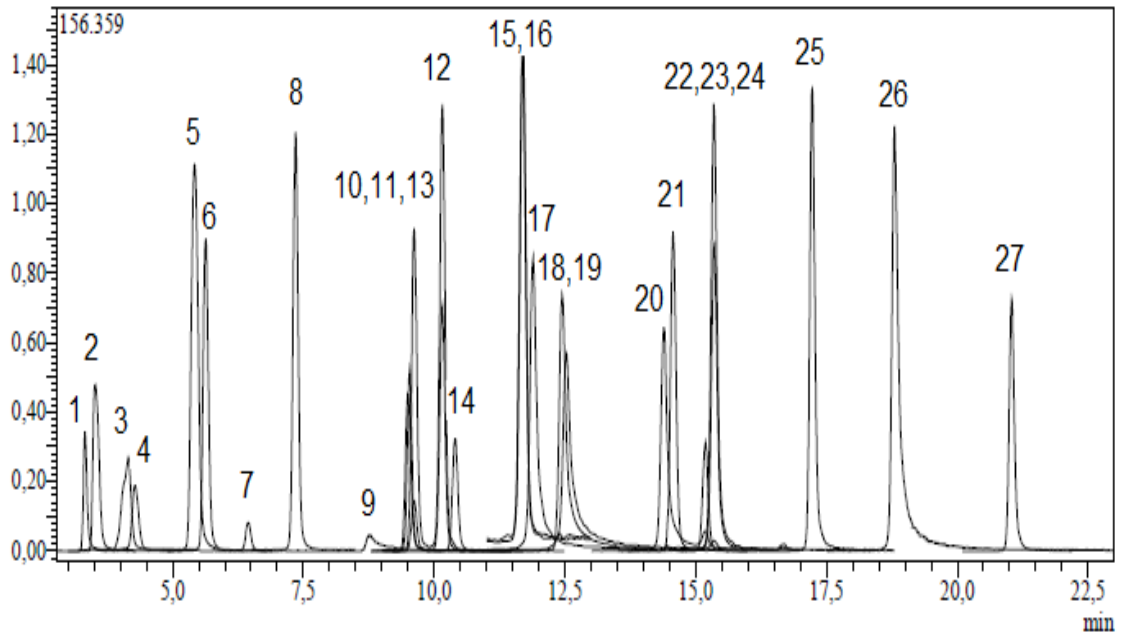
^dRSD: relative standard deviation

^eLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/Limit of quantification

^f U (%): Percent relative uncertainty at 95% confidence level (k=2).

^g Values in µg/g (w/w) of plant methanol extract

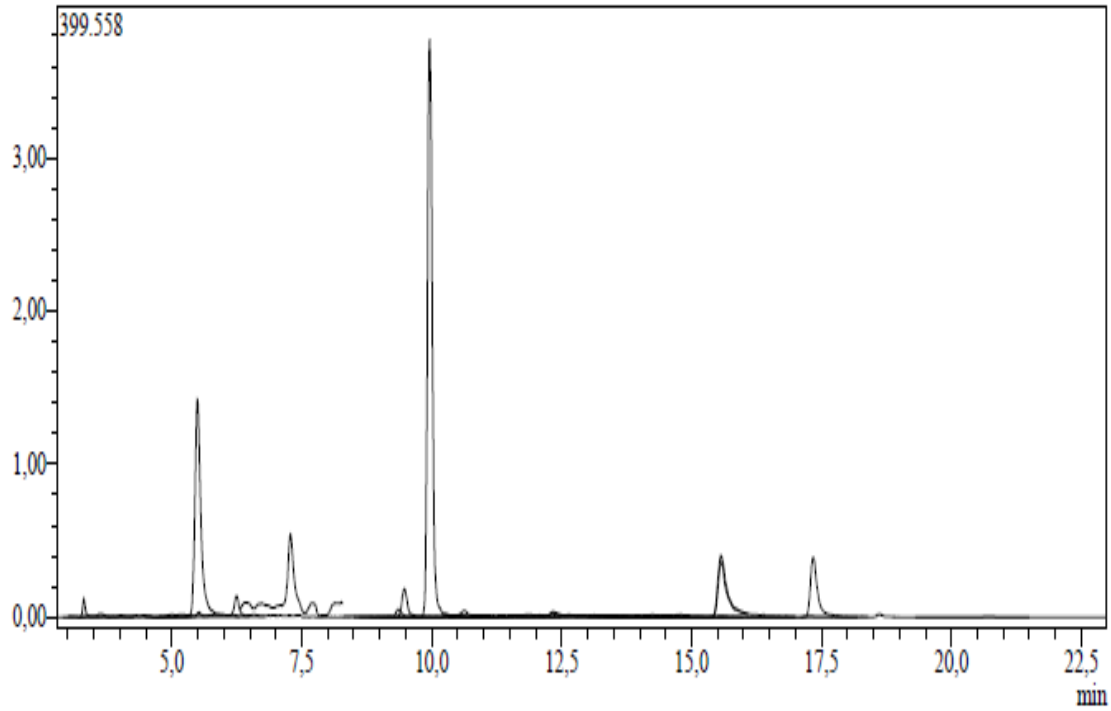
^hN.D: not detected.



Şekil 4.7.1.UHPLC-ESI-MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin kalibrasyon kromatogramları(A)

4. ARASTIRMA BULGULARI

A- 1: Kuinik asit, 2: Malik asit, 3: tr-akontik asit, 4: Gallik asit, 5: Klorojenik asit, 6: Protokatechuik asit, 7: Tannik asit, 8: tr- kafeik asit, 9: Vanillin, 10: p-kumarik asit, 11: Rosmarinik asit, 12: Rutin, 13: Hesperidin, 14: Hiperozid, 15: 4-OH Benzoik asit, 16: Salisilik asit, 17: Mirisetin, 18: Fisetin, 19: Kumarin, 20: Kuersetin, 21: Naringenin, 22: Hesperetin, 23: Luteolin, 24: Kaempferol, 25: Apigenin, 26: Rhamnetin, 27: Krisin



Şekil 4.7.2.UHPLC-ESI-MS/MS ile *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* fenolik içerikkromatogramı (B)

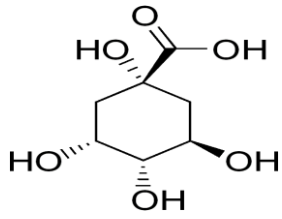
B-N. *nuda* subsp. *lydiae* metanol ekstraktı

Çizelge 4.4. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi fenolik bileşiklerinin kantitatif sonuçları

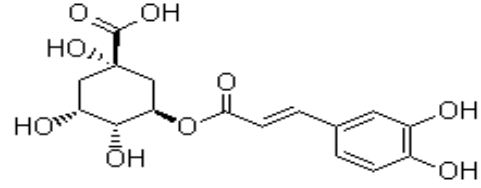
Konsantrasyon (ppb)		
No:	Bileşik	Miktarı
1	Kuinik asit	223,83±11
2	Klorojenik asit	1.325,22±65
3	Kafeik asit	73,3±4
4	Rosmarinik asit	238,06±12
5	Kumarik asit	86,24±4
6	Kaempferol	89,11±5
7	Luteolin	19,4±1
8	Apigenin	56,53±3
9	Rhamnetin	8,59±1
10	Krisin	1,16±0

Çizelge 4.4'deki sonuçlardan anlaşıldığı gibi *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin yapısında ana fenolik bileşik olarak klorojenik asit, rosmarinikasit ve kuinik asit bulunmaktadır. Krisin, rhamnetin ve luteolin ise çok az miktarda bulunmaktadır. Standart olarak kullanılan diğer fenolik bileşikler ise tespit edilmemiştir.

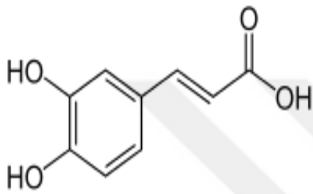
4. ARASTIRMA BULGULARI



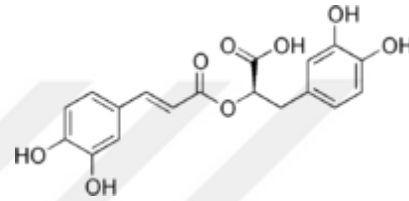
Kuinek asit



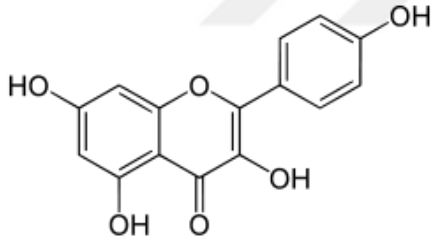
Klorojenik asit



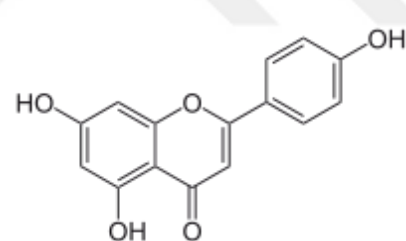
Kafeik asit



Rosmarinik asit



Kaempferol



Apigenin

Şekil 4.7.3. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin bazı fenolik bileşiklerinin (Klorojenik asit, kuinek asit, kafeik asit, rosmarinik asit, kaempferol ve apigenin) açık kimyasal yapıları gösterilmiştir.

Çalışma bitkimizde yüksek oranda bulunan klorojenik asitin kimyasal yapısına bakıldığında göze çarpan fenolik yapıların serbest radikallere elektron vererek onları giderme özelliğine sahip olması antioksidan aktivite sonuçlarını desteklemektedir (Aras ve ark. 2016a).

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Bu alışmada *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitki ekstrelerinin fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi biyoaktif bileşiklerin antioksidan aktivite üzerine etkisi, farmasotik değerinin ön plana çıkarılması, doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Nepeta L. cinsinin, Dünya’da yaklaşık 250 türü olduğu düşünülmektedir. *Nepeta* türleri Orta ve Güneybatı Asya yoğunlukta olmak üzere, Afrika’nın kzeyinden, Avrupa, Orta ve Kuzey Amerika’ya, Hindistan’dan in’e kadar çok geniş bir alana yayılış göstermiştir (Hedge 1992).

Birçok *Nepeta* türü hoş kokulu, uçucu yağlar açısından zengin, potansiyel ekonomik faydası olan, bakteri öldürücü, dem ve astım giderici, ateş düşürücü, adet akışını artırırcı, dezenfektan, yatıştırıcı, soğuk algnlığını tedavi edici, lipit ve protein seviyelerini düşürücü, öksürük kesici olarak halk arasında asırlardan beri kullanılmaktadır (Kılıç ve ark. 2011, Yılmaz 2011, Kılıç 2013).

Anadolu’nun hemen her yöresinde özellikle Güneybatı Anadolu’da yaygın olarak görülen *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*, 600-1700 m rakımlarda habitat olarak *Pinus nigra* ormanı açıklıklarında, alpinik step, nemli yerler, akıntı kenarları, yol kenarlarında yetişmektedir (Hedge ve Lamond 1982).

Antioksidan zellik gösteren temel bileşenler fenolik bileşikler ve flavonoidlerdir (Connor ve ark. 2002, Guo ve ark.2003). Fenolik bileşikler ve flavonoidler, temel maddeleri fenol olan ve güneş ışığı yardımıyla bitkilerin hemen her kısmında bulunabilen ve fotomorfogenez reaksiyonları sonucu oluşan organik bileşiklerdir. Suda ve organik çözücülerde znrlr. Flavonoidler, bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Polifenolik bileşikler ve flavonoidler, lipid peroksidasyonu gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini inhibe ederek metal iyonlarını şelatlayıp oksidasyonu azaltarak antioksidan özellik gösterirler (Stevenson ve Hurst 2007).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıl, baklagil, meyve, bitki ve bitki kaynaklı içeceklerde çokça mevcuttur. Doğal kaynaklı antioksidanlar; tokoferol, flavonoid, fenolik asit gibi fenolik bileşikler, alkaloid, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir.

Yapılan bazı çalışmalar polifenollerini içeren bitkilerin oksidatif strese bağlı kronik hastalıklara etki ettiğini gösteriyor (Leopaldini ve ark 2011, Pereraa ve ark 2016). Fakat Babbar ve ark. (2011) yürüttüğü bir araştırmada sadece fenolik bileşiklerin, bitki özlerinin antioksidan aktivitesinden tek başına sorumlu olmadığını belirtmişlerdir. Sinerjik etki ile birlikte askorbatlar, tokoferoller, indirgen karbohidratlar, terpenler, karotenoidler ve pigmentler gibi diğer unsurların varlığı muhtemelen toplam antioksidan aktiviteden sorumlu olabilir.

Daha önceleri, kanser progresyonunun oksidatif stresle kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bu nedenle, test edilen bitki materyalinin antioksidan etkisinin doğrulanması günümüzde çeşitli karsinoma hücre hatlarına karşı anti-proliferatif etkinlik analizi ile tamamlanmaktadır (Loizzo ve ark. 2014, Da Costa ve ark. 2015). Fenilpropanoidlerin olması durumunda, normal hücrelere toksik olan bileşikler (örneğin Podofilotoksin) bu anti-karsinomatöz etkiden sorumlu olabilir (Dewick, 2009). Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar, diyet fenoliklerinin (örneğin flavonoidlerin) anti-proliferatif etki gösterebileceğini göstermektedir (Ferry ve ark. 1996, Anter ve ark. 2011). Tıbbi bitkilerin anti-neoplastik ajanların başlıca kaynakları olduğu gerçeğine rağmen yenilebilir bitkilerin anti-proliferatif etkilerinin araştırılmasına artan bir ilgi bulunmaktadır (De la Rosa ve ark. 2014).

Maliyetinden dolayı doğal antioksidanların yerine 1900'lerin ilk çeyreğinden itibaren sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Fakat yapay antioksidanlar toksik ve kanserojen madde içerdiğine dair bazı çalışmalar ortaya konduğundan bazı ülkelerde kullanım alanlarına kısıtlamalar hatta yasaklamalar getirilmiştir (Dragsted ve ark. 1993). Sentetik antioksidanlardan en sıkça kullanılanların başında gelen BHA ve BHT'nin bazı olumsuz yan etkilerine rastlandığından son yıllardaki araştırmalar tamamen bitki kaynaklı doğal antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin ve ark. 2011). Yapay antioksidanların yan etkileri anlaşıldığından, doğal antioksidanlara yönelim artmış ve bu

sahadaki çalışmalar doğal orjinli antioksidanlar üzerine dönmüştür. Doğal antioksidanlardan olan E ve C vitaminleri uzun zamandır besinlerde ayrı ayrı ya da sinerjist etkiden dolayı beraber kullanılırlar. Fakat askorbik asidin ve tokoferolnantioksidan aktivitesi yapay antioksidanlara nisbeten daha zayıftır. Bitki kökenli antioksidanlar singlet ve triplet oksijen söndürücüsü, serbest radikal gidericisi, peroksit yok edicisi ve enzim inhibitörleri olarak fonksiyon görürler (Dragsted ve ark. 1993).

Bir bitkinin tedavi etmedeki kullanılabilirliğini ve radikallere karşı etkinliğini saptayabilmek için, ancak bitkinin içerdiği maddelerin belirlenmesiyle ortaya çıkartılabilir (Larson 1998). Bu nedenle dünyanın birçok yerinde halk arasında yaygın olarak kullanılan *Nepeta Nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin LC-MS/MS analizi yapılarak içerisindeki maddeler tayin edildi.

Bitkilerdeki etkin bileşenlerin aktivitesi, bitkinin toplanma zamanı, kurutulması ve depolanması sırasında uygulanan işlemlere göre değişkenlik gösterir. Her bitkinin içerisindeki etken maddesinin etkisinin en yüksek olduğu zaman dilimi vardır. Bu sebeple en doğru zamanda toplanmalıdır (Baytop 1999). Bir dönemde toplanan bitki tıbbi yönden etkili iken diğer dönemlerde etkili olmayabilir (Atata ve ark. 2003).

Son zamanlarda antioksidan etkinliğe sahip bitkilerin gıda ve farmakoloji sahalarındaki kullanımlarıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ve halen yoğun bir şekilde sürmektedir. Bunun nedeni ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoit, flavonoit ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve bu bileşiklerin herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır.

Bitkilerde doğal antioksidan aktivitelerin belirlenmesi ve bazı antioksidan bileşikleri izolasyon ve karakterizasyon işlemleri oldukça büyük bir ivme kazanmış ve bu konuda çok yoğun çalışmalar devam etmektedir. Bahusus gıda sektöründe ve alternatif tıpta tedavi maksatlı kullanılan bazı bitkiler antioksidan çalışmaların merkezi haline gelmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmaları, doğal bitkilerin veya onlardan saflaştırılan etken maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması çalışmalarının önemli

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

bir kısmını oluşturmaktadır. Antioksidan aktivite belirleme metotları, toplam indirgeme kapasitesinin araştırılması, metal şelatlama aktivitesi, serbest veya iyonik radikallerin giderilmesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin 2007).

DPPH[•], ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} radikallerinin kullanıldığı yöntemler, yiyecek, içecek ve bitkisel ekstraktların antioksidan aktivitelerinin tayin edilmesi için kullanılan en yaygın spektrofotometrik yöntemlerdir. Ayrıca DPPH[•] ve ABTS^{•+} giderme metodları hızlı, basit, seçici ve tekrar edilebilir işlemler olmaları nedeniyle antioksidan ekstre veya bileşiklerin etkinliklerini tayin etmek için çokça kullanılmaktadır (Özçelik ve ark. 2003). Bu radikallerden herhangi birine antioksidan madde eklendiğinde; DPPH[•] ve ABTS^{•+} oluşumu durduğundan bir renksizleşme oluşur. Menekşe renkli DPPH[•] ve yeşil-mavi renkli ABTS^{•+} kromojenlerini kullanmak kolaydır. Bu metotlar yüksek duyarlılığa sahiptir ve aynı zamanda çok sayıda numunenin analizinde uygundur (Awika ve ark. 2003).

Son yıllarda serbest radikallerin giderilmesini ölçmek ve yeni doğal antioksidan kaynakları keşfetmek için birçok antioksidan metod geliştirilmiştir. Bu metodlardan yaygın olarak kullanılanlar; tiyosiyanat yöntemi, metal iyonları indirgeme kapasitesi (FRAP ve KUPRAK), DPPH serbest radikal, ABTS^{•+} katyon radikali, DMPD^{•+} radikali giderme aktivitesi, PMS-NADH-NBT sistemi, süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu antioksidan metotlar uygulama kolaylığı, hassaslıkları ve analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği gibi avantajları sebebiyle çok sıkça kullanılmaktadır (Bursal 2009).

Gıda antioksidan kapasitesi farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanın karışımı ile belirlendiği için, bu sinerjistik etkileşimler arasında, in vitro olarak, gıda maddelerinin antioksidan kapasitesini belirlemek için, birden fazla yöntem birleştirmek gereklidir (Frankel ve Meyer 2000, Jiménez 2008).

Bu nedenle renk kaybolması esasına dayanan iki oksidan sistem olan DPPH ve ABTS serbest radikalleri bu çalışma için seçilmiştir. Bu yöntemler tipik olarak birer radikal olan ABTS ve DPPH radikallerinin giderilmesiyle ürünün renksizleşmesi esasına dayanır. Bu renksizleşme derecesini uzaklaştırılmış olan ABTS ve DPPH miktarını etkiler. ABTS ve DPPH giderme yöntemlerini kullanarak gıda ve kimyasal

bileşiklerin antioksidan kapasitesini belirlemek en popüler spektrofotometrik yöntemler arasında yer almaktadır (Kuskoski ve ark. 2005, Kim ve ark. 2002).

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisinin liyofilize su ve etanol ekstresinin antioksidan özellikleri ile ilgili yaptığımız bu çalışmada Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, Kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitesi, ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelat aktivitesi, DPPH serbest radikali, ABTS^{••} giderme aktivitesi ile ferik tiyosiyanat metodu gibi farklı metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda antioksidan etkileri ayrı ayrı belirlendi. Kullanılan antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan *Nepeta nuda* subsp. *Lydiae* bitkisinin liyofilize su ve etanol ekstresinin aktiviteleri birer antioksidan olan BHA, BHT, Askorbik asit ile karşılaştırmaları yapıldı.

Birçok çalışma fenolik içerik ve antioksidan aktivite arasında ilişki olduğunu ortaya koymuş ve bazı bilim insanında fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasında kuvvetli bir korelasyon tespit etmişlerdir (Kuskoski ve ark. 2005, Mahattanatawee ve ark. 2006, Silva ve ark. 2007, Thaipong ve ark. 2007, Reddy ve ark. 2010), bazılarıda aralarında herhangi bir korelasyon tespit edememişlerdir (Imeh ve Khokhar 2002; Ismail Marjan ve Foong 2004). Birçok kanıt C vitamininin meyve ve sebzelerde kuvvetli bir antioksidan olduğunu göstermektedir. Diyet askorbik asit alımı yüksek olan kişilerin sürekli olarak gelişen kanser ile arasında düşük bir risk ile ilişkili bulunmuştur (Leong ve Shui 2002).

Gilve ark. (2002), DPPH yöntemiile belirlemiş olduklarına göre nektarin, şeftali ve erik meyveleri için askorbik asit ve antioksidan aktivite arasında bir korelasyon yoktur. Barreto ve ark. (2009), Temel Bileşen analizi (PCA) yöntemini uygulayarak ABTS ile saptadıklarına göre askorbik asit ile serbest radikal giderme aktiviteleri arasında çok düşük bir korelasyon olduğunu kanısına varmışlar. Kalt ve ark. (1999), çilek, ahududu, yüksek ve düşük çalı yaban mersini için askorbat içeriği ve antioksidan aktivite arasında negatif korelasyon ($R = - 0.80$) olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda antioksidan aktivite ölçümlerinin yapılabilmesi için hazırlanan her bir ekstreden 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlar alınmıştır. Sonuç olarak elde

ettiğimiz bulguların bazı ekstrelerin artan miktarı ile genellikle orantılı olarak antioksidan aktivitede artma görülmüş ve bu anlamda bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan, ekstre miktarının artışı etken madde miktarının da artışı sağlanmaktadır. Ortaya çıkan bu korelasyonun nedeni bitkilerin ihtiva ettiği antioksidan özelliği olan fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoidler, kumarinler vs.), azotlu bileşikler (alkaloidler, aminler vs.), vitaminler, terpenoidler gibi birçok radikal giderici bileşik olabilir.

Ekstrelerin farklı yöntemlerle yapılan antioksidan tayinleri arasında ilişki bulunabilir. Örneğin bir bileşiğin indirgen olması o bileşiğin antioksidan etkinlik göstermesinde önemli bir neden olabilir (Meir ve ark. 1995). Antioksidant aktivite farklı yol ve mekanizma ile yürütülebilir. Örneğin, oksidasyona geçiş metallerinin sebep olduğu bir durumda, antioksidan maddenin indirgen özelliği, antioksidan etki açısından pek önemli olmayabiliyor. Bir ekstre ya da bileşik serbest radikal giderme aktivitelerden herhangi birine sahipse, örneğin yalnızca sadece metal şelatlama özelliğine sahip olması bile böyle bir sistemde oksidasyon hızında yavaşlamaya sebep olacaktır. Metal şelatlama özelliğine sahip bir ekstre ya da bileşiğin antioksidant aktivitesi, onun indirgeme kuvveti veya ihtiva ettiği -OH gruplarından çok ortamda mevcut metalleri uzaklaştırma özelliğiyle alakalıdır. Oksidasyona singlet oksijenin neden olduğu durumlarda ise etkin antioksidanlar singlet oksijenini giderici maddelerdir. Karotenoidler bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Halliwell ve ark. 1989). Bütün bu özellikleri sebebiyle antioksidan maddeler sahip oldukları antioksidatif etkinliklerini geçiş metallerini bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen koparılmasını engelleme, radikal giderme gibi değişik mekanizmalarla ortaya koyabilirler (Diplock 1997).

In vivo olarak serbest demir ve bakırın varlığı incelenebilmektedir. Sindirim sırasında barsaklar tarafından emilen demir iyonları transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+}) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şeklinde ferritin ve hemosiferin proteinlerinde depolanır. Transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer “demir havuzu” olan ferritin ve hemosiferinde depolanırlar. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmayan bir formda olup, seruplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994).

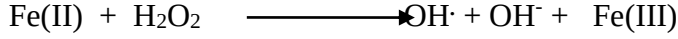
Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde hidroksil radikali oluşur (Chevion ve ark.1993). Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya lizis olmuş hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Bu durum hücre ve dolayısıyla doku hasarını daha da hızlandırır. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalığı (substantia nigra) mevcut hücrelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları l hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır. Böylece parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır. Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigranın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunun yanısıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol guruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Pacific ve ark. 1991).

Ferröz (Fe^{2+}) iyonu gibi iyonik türler, organizmada serbest radikal ve reaktiflerin üretimini arttırdığı için bu metallerin etkisi minimize edilmelidir. Bunu sağlamak için ise metal iyonlarının şelatlanması önemli bir yoldur. Metallerin katalizlediği oksidasyon tepkimelerini tamamen durdurmak ya da yavaşlatmak için metal şelatlama aktivitesi sık sık kullanılan önemli bir antioksidan yöntemdir. Demir, organizmalar için esansiyel bir mineraldir, fakat aşırısı hücre hasarına sebep olabilir. Bir geçiş metali olan ve bu grubun tüm karakteristik özelliklerine sahip demir yüksek aktivitesinden nedeniyle lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinir. Demir iyonlarından olan ferröz iyonları (Fe^{2+}), bilinen en önemli prooksidan iyonlardandır. Fenton tepkimelerinde peroksitlerin ortamda mevcut olmasıyla ferrik iyonlar (Fe^{3+}) da meydana gelebilir, fakat ferröz iyonları (Fe^{2+}), ferrik iyonlarından (Fe^{3+}) on kata daha fazla reaktiftirler (Miller 1996). Bu tepkimeler neticesinde peroksitlerden daha reaktif olan hidroksil radikalleri de oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1984, Gülçin 2007).

Çeşitli metal tuzlarının H_2O_2 ile etkileşmesi ile hidroksil radikali oluşur. Çoğu zaman bu metal iyonu demirdir, fakat demirin yanı sıra aynı reaksiyonu bakır da

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

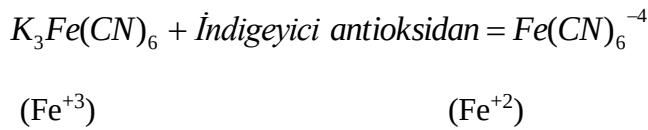
verebilir. Fe^{+2} tuzlarının H_2O_2 ile etkileşerek hidroksil radikalini oluşturmaya Fenton Reaksiyonu adı verilir. Fenton Reaksiyonu'nun stokiyometrisi aşağıdaki gibidir:



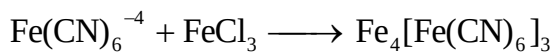
Oksidatif stres sonucu intaselüler serbest Ca^{+2} 'nin ve Fe(III) 'ün konsantrasyonunun arttığı ispatlanmıştır. Ayrıca oksidatif stres sonucu ferritinden Fe(III) 'ün mobilizasyonu artar. Dolayısıyla bir Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikalinin oluşumu oksidatif strese bağlı olarak artar (Aras 2012, McCord 1983).

Fenton reaksiyonları sonucunda hidrojen peroksit göre daha reaktif ve metabolizmaya daha zararlı hidroksil radikali oluşmaktadır. Bundan dolayı ferröz iyonlarının (Fe^{2+}) ortamdan giderilmeleri veya uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Fenton tepkimelerinde peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonları oluşur fakat ferröz iyonları (Fe^{2+}), ferrik iyonlarından (Fe^{3+}) on kata daha fazla reaktif oldukları için negatif etkiler büyük ölçüde giderilmiş olur (Miller 1996).

Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme metodunda; $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ (potasyum ferrisiyanat) bileşiği antioksidan kapasitesi olan bir madde eşliğinde Fe(CN)_6^{-4} ferrosiyanata dönüşmektedir. Burada ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenmektedir.



Kalitatif veya kantitatif indirgenme tayini için ortama FeCl_3 ilave edilir. İndirgenmiş ürüne Fe^{3+} ilavesi, 700 nm'de güçlü absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $\text{Fe}_4[\text{Fe(CN)}_6]_3$ oluşumuna yol açar. Absorbansdaki artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı ve dolayısıyla indirgenme kapasitesini göstermektedir (Gülçin ve ark. 2005).



Çalışmada analiz edilen *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstrelerinin indirgeme kapasitesi de standart antioksidanlar gibi artan ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmakta fakat artış miktarlarının nisbeten az olduğu anlaşılmaktadır. Ekstrelerin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/ml) özeltilerinin 700 nm’deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. BHA, BHT ve askorbik asit benzer indirgeme kapasitesi sergilemiştir. BHA diğer standart antioksidanlara göre daha etkin bir indigeme kapasitesi sahip olduğu anlaşılmaktadır.

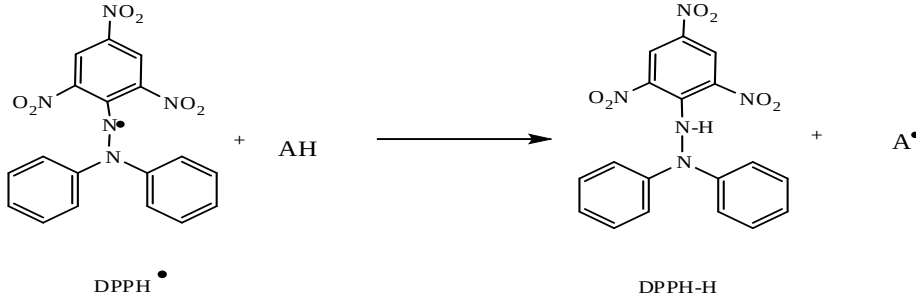
Serbest radikaller, insan vücudundaki biyolojik moleküllerin oksidatif hasarının birincil nedenidir. Yaşlanma, kanser, alzheimer ve koroner kalp hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Siriwardhana ve ark. 2003, Hu ve ark. 2010).

DPPH istikrarlı bir serbest radikaldir ve proton radikal sprclerine maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde azalır. Antioksidanlar DPPH’a bir elektron veya bir proton transfer ederler. Böylece radikal karakterlerini nötralize ederler. DPPH gıdalarda ve biyolojik sistemlerde indirgeyici maddeleri ölçmek için yaygınca kullanılır (Leong ve Shui 2002, Hu ve ark. 2010).

DPPH metodu antioksidan aktiviteyi tayin etmek için kullanılan en eski metoddur. İlk olarak 1950’de doğal materyallerdeki H-donrlerini bulmak için önerilmiştir. Sonraları hem fenolik bileşiklerin hem de yiyeceklerin biyolojik açıdan önemli kısımlarının antioksidant potansiyelini tayin etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bu test, fenolik bileşiklerdeki H-donörlerinin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest kararlı radikali ile tepkime kapasitesi temeline dayanmaktadır. DPPH görünür bölgede (517 nm) oldukça şiddetli absorbsiyon verir, böylece UV-vis spektroskopisi ile kolayca tayin edilebilir (Roginsky ve Lissi 2005).

DPPH genellikle serbest radikal temizleme etkinliğini belirlemek için kullanılır (Abbs ve ark. 2013). DPPH metoduna göre; kullanılan serbest radikal DPPH• 517 nm’de absorbans veren organik yapılı bir maddedir. Bu serbest radikal antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek, radikal olmayan DPPH-H molekülüne dönüşmektedir. DPPH serbest radikalleri ortamda azaldığı için absorbans miktarında azalmalar oluşmakta ve bu olaydan faydalananarak antioksidan aktivite miktarı

hesaplanabilmektedir.



Şekil 5.1. Bir antioksidanın DPPH• radikalini gidermesi (Gülçin 2010).

DPPH, istikrarlı bir serbest radikaldir ve radikal süpürücü protona maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde azalır. Antioksidanlar DPPH'a hem elektron hemde hidrojen atomu transfer ederek serbest radikal olma özelliğini giderir. DPPH gıda ve biyolojik sistemlerde indirgeyici maddeleri belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir serbest radikaldir.

DPPH• radikali giderme aktivitesi çalışmasında 517 nm'de azalan absorbans arta kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir.

DPPH radikali uzun ömürlü ve azot merkezli bir radikaldir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik ve ark. 2003). Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası hidrojen veren guruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır.

Serbest radikallerin organizmadan süpürülmesi birçok biyomolekül için çok hayati bir önem arzeder. Çünkü radikalik zincir tepkimelerin başlamasına ve gelişmesine serbest radikaller sebep olmaktadır. Böyle bir durumda lipidlerin, proteinlerin, monosakkaritlerin ve DNA gibi hayati önem arz eden biyomoleküllerin stabilitesi bozulmakta kalp krizleri, damar tıkanıkları gibi birçok hastalığa ve yaşlanma gibi birçok biyolojik sürece neden olduğu bilinmektedir (Halliwell 1989).

Bu çalışmada diğerk standart antioksidanlara kıyaslandığında kullanılan *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin ekstrelerinin radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Fakat grafik değerleri, *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* ekstrelerinin standartlara nisbeten daha az radikal söndürücülere sahip olmalarıyla aıklanılabilir. Artan konsantrasyonlarda bağlı olarak ekstrelerin etkinliği karşılaştırıldığında her farklı konsantrasyonda azda olsa gittikçe artan bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu saptanmıştır. 517 nm’de absorbansın gittikçe azalması geriye kalan DPPH• zeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir. *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi etanol ve su ekstrelerinin standart antioksidanlar benzer DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir.

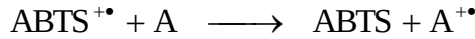
Dolayısıyla *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin su ve etanol ekstreleri muhtemel başka etkileri ile beraber vücutta hasara neden olan serbest radikallerden olan DPPH• serbest radikalini kısmen giderdiği anlaşılmaktadır.

Antioksidan ve fenolik maddeleri ihtiva eden 112 farklı şıfalı bitkinin kansere karşı etkilerinin bulmak için total antioksidan kapasitesine ve total fenolik ieriğinine bakılarak yapılan çalışmada bu bitkilerin antioksidan kapasite ile total fenolik muhteva arasında pozitif ilişki bulunmuş ve fenolik içeriğin antioksidan etkiyi oluşturan temel yapı olduğu dşnlmştir. Diğer sebze ve meyvelere nisbeten bu bitkilerin çok yüksek antioksidan etkiye ve yüksek fenolik bileşik muhtevasına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerin doğal bileşimlerinin kanser tedavisinde ajan kaynağı olarak kullanılabileceği ileri srlmştir (Cai ve ark. 2004).

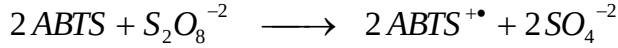
Biyolojik sistemlerde, gıda ve farmasötik sanayilerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek açısından antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri çok önemlidir. Bu sistemlerde serbest radikaller meydana gelmekte ve dolayısıyla farmasötik ve gıda sanayinde lipid peroksidasyonunu hızlandırmakta ve ürünün kalitesini düşürmektedir (Min 1998).

ABTS^{•+} radikali 734 nm’de absorbans veren renkli bir maddedir. ABTS^{•+} radikali, antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek bir elektron transfer eder ve radikal olmayan ABTS maddesine dönüşür. Dolayısıyla bu dalga boyundaki absorbans azalması antioksidan aktivitenin hesaplanmasında kullanılır.

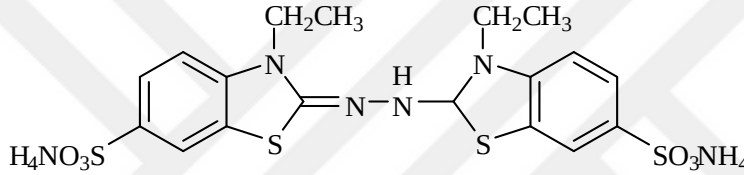
5. TARTIŞMA VE SONUÇ



Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisi liyofilize su ekstresinin $ABTS^{+\bullet}$ giderme aktivitesini belirlemek için öncelikle ABTS çözeltisine, potasyum persülfat ilave edilerek $ABTS^{+\bullet}$ radikali oluşturulur (Gülçin 2007).



ABTS radikal katyonu farklı oksidan maddelerle hazırlanabilir. Oksidan olarak $K_2S_2O_8$ kullanılabildiği gibi Mn_2O_3 'de kullanılabilir. Potasyum persulfat veya Mn_2O_3 varlığında ABTS'den ABTS radikalleri ($ABTS^{+\bullet}$) meydana gelebilir.



Şekil 5.2. ABTS'nin kimyasal yapısı

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer antiradikal test olan $ABTS^{+\bullet}$ giderme aktivitesi testi sonuçlarımıza göre bitki ekstralarının radikal giderme aktivitelerine bakıldığında *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* etanol ve su ekstralarının aktivitelerinin standart antioksidanlara göre çok düşük miktarda $ABTS^{+\bullet}$ radikali giderme aktivitesi sergilediği çalışma bulgularından anlaşılmaktadır.

Çalışmalarımızda uyguladığımız bir diğer metod Kuprak metodu son zamanlarda Apak ve grubu tarafından indirgeme gücü analizi için geliştirilen diğer önemli bir metottur (2006). Bu metot, düşük maliyeti ile beraber hızlı ve kararlı bir metottur. Ayrıca indirgeyici ajanın tipine veya hidrofilikliğine bakılmaksızın, farklı antioksidanlar için uygulanabilir bir metottur. Kuprak metodu bir kromojenik redoks reaksiyonu olup fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH:7) gerçekleştirilir (Apak ve ark. 2005, Köksal ve ark. 2009). Bu metot, glutatyon gibi tiyol gurubu içeren antioksidanların aktivitelerinin ölçümünde sıklıkla kullanılabilir (Huang ve ark.2005).

Doğal fenolik çözeltilerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, çözeltilerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Fenoliklerin kuprik

iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 $\mu\text{g/ml}$) zeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi.

Kuprak metoduna göre indirgenme kapasitesi tayini de gerçekleştirilmiş olup, *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstrelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi standart antioksidanlar gibi artan konsantrasyonu ile arttığı tespit edilmiştir. Su ve etanol ekstrelerinin indirgeme gücü standart antioksidan bileşiklerden az olmakla birlikte, askorbik asite yakın olduğu ve dolayısıyla antioksidan özelliğinin olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerden elde edilen özütler ya da bunlardan saflatırılmı bileşiklerin total antioksidan etkilerinin tesbitinde birçok metot kullanılır (Miller ve ark. 1996). Ferrik tiyosiyanat yöntemine göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan parametrelerden biridir. Ferrik tiyosiyanat metodu, lipit peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksitin miktarını ler. Bu biyoanalitik analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asidin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Bu metodun esası linoleik asit emülsiyonun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidin spektrofotometrik olarak 500 nm'de llmesine dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e yükseltir. Daha sonra Fe^{3+} , ilave edilen amonyum tiyosiyanat ile kompleks oluşturarak 500 nm'de maksimum absorbans verir.

LC-MS/MS analiz sonuçlarına göre fenolik içerik analizi yapılmıştır. En fazla klorojenik asit, Rosmarinik asit,kuinik asit, Kaempferol ve Kumarik asit bileşikleri tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları polifenolik yapıdadır. Bu kimyasal yapılarında bulunan aromatik halkalardaki fenol gruplarından dolayı elektron vererek radikalleri gidermesinden dolayı antioksidan özellikler göstermiştir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada antioksidan özellik ile fenolik bileşikler arasında pozitif korelasyon olduğu anlaşılmıştır. Źugi ve ark. (2014) içinde *Nepeta* trnnde bulunduğu 10 adet bitki üzerinde yaptıkları çalışmada fenolik bileşikler ve antioksidan etki arasında pozitif korelasyon olduğu yönünde bulgulara ulamılardır. Pacifico ve ark. (2015) *Nepeta calamintha*'nın biyoaktif polifenoller içerdiklerini ve

antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduklarını belirlemişlerdir. Vinokur ve ark. (2006), gül yaprağındaki radikal süpürücü aktivitenin çoğunlukla içerdikleri yüksek fenolik içeriğe bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Fenolik bileşikler, gıda kalitesi üzerindeki etkileri ve belli kanser türlerinin patojenezinde koruyucu ve önleyici rolleri nedeniyle özellikle bilim insanlarının, üreticilerin ve tüketicilerin ilgisini çekmektedir (Bursal 2013, Shahidi ve Naczsk 2004).

Bu çalışmalar ışığında LC-MS/MS analiz sonuçlarına göre klorojenik asit, kuinik asit, kafeik asit, rosmarinik asit, kaempferol ve apigenin gibi fenolik bileşikler içeren *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar etki göstermelerinin bu fenolik bileşiklerle alakalı olduğu yönünde birçok çalışma mevcuttur.

Fenolik bir bileşik olan klorojenik asit, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik rahatsızlıkların tedavisinde etkili doğal ilaçlar olduğu gösterilmiştir (Kraehenbuehl 2017). Klorojenik asit, genellikle bitkiler tarafından, mikrobik patojenler, mekanik yaralar ve UV veya görünür ışığa doğrudan maruz kalma ile tetiklenen çevresel streslere karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak üretilirler (Clifford 1999, Madala ve ark. 2014, Kraehenbuehl 2017).

Nepeta nuda subsp. *lydiae* bitkisinin içerdği bileşiklerden biri olan rosmarinik asitin fare akut akciğer hasarı modelinde güçlü bir anti-inflamatuar etki yaptığını, bu nedenle rosmarinik asitin bir fare atığı astımı modelinde potansiyel terapötik etkilere sahip olabileceği ayrıca, inflammatuar hücre birikimini etkili bir şekilde inhibe ettiği Liang ve ark (2016) tarafından ileri sürülmüştür.

He ve ark.(2016), apigenin ön-muamelesinin, antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler yoluyla sisplatinle bağlı böbrek hasarını belirgin derecede zayıflattığının anlaşıldığını öne sürmüşlerdir.

Kanser gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın ölüm nedenidir. Kanserinin vücuda nasıl yayıldığını açıklayan birçok yöntem vardır. Bu metotlardan biri gösteriyor ki kanser ilk olarak vücudun belli bir bölgesine etki eder ve daha sonra vücudun her tarafına yayılır (Evan 2002, Ueda ve ark. 2002). Dolayısıyla kanserin erken teşhis edilmesi gerekir ki vücudun diğer bölgelerine yayılmasın. Çünkü yayıldıktan

sonra tedavi etmek çok gctr. Bununla birlikte, kanser tedavilerinde cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi gibi çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımların hepsi vücuttan kanserli hücreyi yok etmeyi amaçlanmıştır. Ancak her yaklaşımın birkaç yan etkisi vardır (Kintzios ve ark. 2004). Bundan dolayı şimdi daha az yan etkisi olan ilaçların kefine çalışılmaktadır. Çeşitli kanser tedavileri için birçok kemoterapik ajan bulunmuştur. Bu ajanlar bazen ayrı olarak bazende kemoterapik ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların çoğu sentetik ve çok sayıda yan etkileri vardır. Bitki kaynaklarının her zaman en güvenilir tedavi kaynakları olduğu bilinmelidir (Rahman ve ark. 2016). Bu evrensel gerçeği dikkate alarak bu çalışmamızda farklı hastalıkların tedavisinde daha az yan etkisi olan doğal bir kaynaktan doğal ilaç elde etmenin mümkün olduğunu göstermeyi amaçladık.

Yine, antibiyotik direnci klinisyenler ve ilaç sanayisi için bulaşıcı hastalıkların tedavisinde büyük bir küresel endişe haline gelmiştir (Bauer ve ark. 2003). u anda kullandığımız birçok antibiyotik ilaç direncinden dolayı patojenler karşı daha az aktif hale gelmiştir. Diğer taraftan yeni kefedilmi ilaçlar istenmeyen pek çok yan etkiye sahiptirler. Dolayısıyla antimikrobiyal ajanlar keşfetmek için ıfalı bitkilerin analizi tedavide yeni verimli bir yol olacaktır (Shahidi 2004, Runyoro ve ark. 2006).

Farklı zc sistemindeki bitki ekstrelerinin Antimikrobiyal aktivite değerlendirmesi disk difüzyon yöntemine göre belirledik. Bitki ekstreleri ekstrakte edildiği çözücü türlerine göre genel bir değer değerlendirilmesi yapıldığı zaman hem bakteri hem de maya türlerine karşı, *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitki ekstresinin önemli derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Maya ve bakterilere uyguladığımız ekstrelerin birçok bileii ihtiva ettiği dlrse ve bu bir arada bulunan bileşenlerin sinercik ve antagonizma etkileri dikkate alınırsa bitki ekstresinin yüksek bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği söylenebilir. Dolayısıyla Bu çalışmanın sonuçları gösteriyor ki; *Nepata nuda* subsp. *lydiae*’dan ekstre edilen bileşikler geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahipler veantibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilirler. Bu nedenle bu bileşiklerin izole edilmesi ve karakterizasyonu için farmakolojik testlere ihtiyaç vardır. Ayrıca, bu bitkiler ekstrelerini güvenlik, etkinlik ve özelliklerini daha iyi anlamak için in vivo araştırılması gerekmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Niksic ve ark. (2012), *Mentha longifolia* L. Hudson'ı uçucu yağların çok iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda da test mikroorganizmaların çoğuna karşı *nuda* subsp. *lydiae* 'dan elde edilen ekstrelerin çok iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Yiğit ve ark. (2003), *M. longifolia*'nın antibakteriyel aktiviteleri üzerine disk difüzyon metodu ile yaptıkları çalışmada; metanol ve kloroform özütleri kullanılmış ve bakteriler üzerine (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*) etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *M.longifolia*'nın metanol ve kloroform ekstraktlarının antibakteriyel etkisinin olmadığını saptamışlardır. Yapılan bu çalışmaya kıyasla kendi çalışmamızda ise etanol ekstraktı *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes* 'a karşı yüksek etki ettiklerini fakat *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* 'a karşı etkilemediklerini tespit ettik.

Al-Bayati (2009), yapmış olduğu çalışmada *Mentha longifolia* L. Hudson'un uçucu yağından elde edilen mentolün antimikrobiyal aktivitesi patojenik ve patojenik olmayan 7 mikroorganizmaya (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*) karşı test etmiş. Disk difüzyon yönteminde, *P. aeruginosa* hariç test edilen bütün bakterilere karşı aktivite gösteren mentol, en yüksek aktiviteyi *S. mutans*'a karşı, *C. albicans*'a karşı da iyi antifungal etkiye sahip olduğu belirlemiştir. Çalışmamızda ise *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* 'dan elde edilen ekstrelerin *E. coli* ve *S. aureus* 'a karşı hiç antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

Bozkaya (2013), yaptığı çalışmada *lamiaceae* familyasına ait *phlomis*'in disk difüzyon testi sonucunda *P.bourgaei* ve *P.leucophracta* metanol ve etanol ekstraktları *S.aureus* ve *B.subtilis* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise metanol ekstraktı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *B. megaterium* 'a, en düşük antibakteriyel aktiviteyi ise *B. subtilis* ve *E. coli* 'ye karşı gösterdiği belirlenmiştir.

Başer ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada çeşitli lokalitelerden toplanan *S. wiedemanniana* uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitelerinde karvakrol ve timolün patojen mikroorganizmaların inhibisyonu açısından güçlü bir etkisinin olabileceği rapor

edilmiştir. (Kıvanç ve Akgl 1998). Çalışmamız sonucunda *nuda* subsp. *lydiae*’ uçucu yağıda *S. Cereviciae*, *Y. Lipolytica* fungusları; *E. Coli* ve *S. Aureus* hariç bütün mikroorganizmalarımız üzerinde yüksek oranda antimikrobiyal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

Çalışmada incelenen bitki alternatif tıpta tedavi amaçlı kullanılmakla beraber, üzerinde yeterince klinik çalışmalar yapılmamış olması bu bitkinin kimyasal özelliğinin ve biyolojik etkilerinin tam bilinmemesi nedeniyle araştırmaya açık bir alan olduğu düşünülmektedir. Literatürde yapılan araştırmalarda çalışma materyali olan *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* bitkisi ile ilgili daha önce yapılan fenolik içerik analizi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktivite tayini çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bu nedenle sonuçların literatüre katkı sağlayacağı beklenmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abbs, F., Kchaou, K., Blecker, C., Ongena, M., Lognay, M., Attia, H. Ve Besbes, S. 2013. Effect of processing conditions on phenolic compounds and antioxidant properties of date syrup. **Ind. Crops Prod.** 44, 634–642.
- Ak, T. ve Gulcin, İ. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, 174: 27-37.
- Akgl, A. 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknoloji Derneği Yayınları, No: 15, sayfa:451. Ankara.
- Al-Bayati, F. A. 2009. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 8, 20.
- Alim, A., Ismihan, G., Ali, C., Ahmet, D., A., Senay, A. ve Nilufer, V. 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* (Boiss.) gams. **African Journal of Microbiology Research**, 3(8), 463-467.
- Ames, B.M., Shigena, M.K. ve Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antiaxidants and the degenerative diseases of ageing. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, 90, 7915-7922.
- Angioni, A., A. Barra., V, Coroneo., S. Dessi. ve P, Cabras. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 4364-4370.
- Anter, J., Romero-Jiménez, M., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, ., Munoz-Serrano, A. 2011. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. **J. Med. Food** 14, 276–283.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., zyrek, M., elik, ve S.E., Bektasoglu.ve ark. 2007. Comparative evaluation of varius total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the KUPRAK assay. **Molecules**, 12, 1496-1547.

6. KAYNAKLAR

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Erça, E. 2006. The Cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. **International Journal of Food Science and Nutrition**, 57, 292-304.
- Aras, A. 2012. “Bazı 4-(3-metoksi-4-asetoksi)benzilidenamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on türevlerinin sentezi ve in-vitro antioksidan özelliklerinin incelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Aras, A., Bursal, E., Doğru, M. 2016a. UHPLC-ESI-MS/MS analyses for quantification of phenolic compounds of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. 6(11), 009-013.
- Aras, A., Doğru, M., Bursal, E. 2016b. Determination of antioxidant potential of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. **Analytical Chemistry Letters**. Accepted.
- Arslan., B.N. 2007. *Viburnum opulus* ve *V. orientale* Bitki Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M.R. ve Bayıroğlu, F. 1995. Serbest radikal türlerin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, **Sağlık Bil. Derg.**2, 137-142.
- Atata, R.F, Sani, A, ve Ajewole, S.M. 2003. "Effect of stem bark extracts of *Enantia chloranta* on some clinical isolates. **Biokemistri**, 15 (2), 84 – 92.
- Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S., Patil, R.T. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Res. Intern.** 44, 391–396.
- Balunas, M.J.,ve Kinghorn, A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, 78, 431-441.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M. ve Doelman, C.J.A. 1991. Oxidants and Antioxidants: State of the Art. **American Journal of medicine**, 91, 2-13.
- Başer, K. H. C., Özek T., Kırimer N. veTümen, G. A. 2004. Comparative study of the essential oils of wild and cultivated *Satureja hortensis*. **J. Essent. Oil Res.** 16,422-424

- Bauer, J., Rojas, R., Bustamante, B. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 88,199-204.
- Baykal, A. 1998. Serbest radikaller, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayınları, Kars.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’ de Bitkilerle Tedavi Geçmişte ve Bugün. İlaveli ikinci baskı, Nobel Yayınları, 3-210. İstanbul.
- Betteridge, D.J. 2000. What is Oxidative Stress? **Metabolism**, 49, 3–8.
- Blois, M.S. 1958. “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, **Nature**, 181, 1199-1200.
- Boğa, R. 2015. Muş ilindeki saplı meşe (*Quercus robur* subsp. *pedunculiflora*) Yaprak ve palamudu ile bu ağaçtan elde edilen Gezo pekmezinin antioksidan aktivitelerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muş.
- Bozari, S., Agar, G., Aksakal, O., Erturk, F. ve Yanmis, D. 2012. Determination of chemical composition and genotoxic effects of essential oil obtained from *Nepeta nuda* on *Zea mays* seedlings. **Toxicology and Industrial Health** 29(4), 339–348.
- Bozkaya, ., 2013. “Türkiye’de yetişen bazı phlomis türlerinin in vitro antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması” Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Bursal, E. 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bursal, E., Gülçin, İ. 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **Food Research International**, 44 (5), 1482-1489.
- Bursal, E., Köksal, E., (2011b). Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). **Food Research International**, 44 (7), 2217-2221.

6. KAYNAKLAR

- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C. 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. **Food Research International** 51, 66-74.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. ve Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, 74, 2157-84.
- Cao, G., Sofic, E. ve Prior, R.L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 3426-3431.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Ozkan, M. 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi, In Ed. B. Cemeroğlu, meyve sebze teknolojisi. 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Sayfa:1-174. Ankara.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F. 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. **British medical bulletin**, 49(3), 481-93.
- Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhshtein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N. 1993. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia, Possible productive criteria for tissue injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 90, 1102-1106.
- Clarkson, M. P. ve Thompson, S.H. 2000. Antioxidants, what role do they play in physical and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, 72, 637-646.
- Clifford, M.N., 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 79, 362–372.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkheimer, S. ve Hanson, E.J. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 893-898.
- Cortopassi, G.A., ve Wong, A. 1999. Mitochondria in Organismal Aging and Degeneration. **Biochimic et Biophysica Acta**, 183-193.
- Coyle, E.F. 1984. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **The Journal of Applied Physiology**, 56, 831-838.

Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W., Ames, B.N. ve Saul, R. ve ark. 1987. Oxygen Radicals and Human Disease. **Annals of Internal Medicine**, 107, 526- 545.

Çopuroğlu, . 2013. Niğde Yresindeki Bazı Endemik Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Niğde.

Çöllü, Z. 2007. *Urtica pilulifera* L. bitkisinin antioksidant aktivitesinin araştırılması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Da Costa, L.S., Andrezza, N.L., Correa, W.R., Cunha, I.B.S., Ruiz, A.L.T.G., de Carvalho, J.E. ve ark.2015. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and chemical composition of extracts from the leaves and stem of *Chresta sphaerocephala*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 25, 369–374.

Davies, K.J.A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, 50, 279-289.

De la Rosa, L.A., Vazquez-Flores, A.A., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Medina-Campos, O.N., Ávila-Nava, A. ve ark.2014. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. **J. Funct. Foods** 7, 219–228.

Deaton, C.M. ve Marlin D.J. 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress **Clin. Tech. Equine Pract.** 2(3), 278-291.

Dewick, P.M. 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd ed. Wiley & Sons, Chichester, UK.

Dığrak, M., Alma, MH., İçlim, A. ve şen S. 1998. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts, **Pharmaceutical Biology**, 36(5), 1-5.

Dinesh, S.B., Rajendra, C.P., Lalit, S., Veena, P., Priyanka, L. ve Chandra, S. M. 2010. Constituents and antimicrobial activity of the essential oils of six Himalayan *Nepeta species*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 75 (6), 739–747.

Diplock, A.T. 1997. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? **Free Radical Researc.** 27, 511-532.

Dizdaroglu, M. ve Jaruga, P. 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Research**, 46(4), 382-419.

Dorman, H.J.D. ve Deans, S.G. 2000. Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 308-316.

Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. ve Tikkanen, M.J. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. **Food Chemistry**, 83, 255- 262.

Dragsted, L.O., Strube, M. ve Larsen, J.C. 1993. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: Biochemical and biological background. **Pharmacol. Toxicol.** 72(1), 116-135.

Emory, T.G. ve Gaynes, R.P. 1993 An overview of nosocomial infections, including the role of the clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, 6, 428-442.

Ercan, S. 2008. Doğumsal kalp hastalığı olan çocuklarda total oksidan ve antioksidan ile oksidatif stres indeks düzeyleri. Uzmanlık tezi, Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Şanlıurfa.

Ergun, A., Tuncer, Ş.D., Colpan, İ., Yalcın, S., Yıldız, G., Kucukersan, M.K., ve ark. 2002. Yemler, Yem Hijyeni Ve Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Pozitif Matbaacılık, sayfa:465. Ankara.

Erişim: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Nepeta>. Erişim tarihi:26.01.2016

Erişim: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Ball%C4%B1babagiller>. Erişim tarihi:26.01.2016.

Ertas, A., Boga, M., Yılmaz, M.A., Yesil, Y., Tel, G. ve Temel, H., 2015. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. **Industrial Crops Products**, 67, 336-345.

Essawi, T., ve M, Sour. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 70, 343-349.

Evan WC 2002. Trease and Evans pharmacognosy. WB Saunders. P 585 London, UK.

Evrenesoğlu, Y. 2002. Ateş yanıklığına duyarlı ve dayanıklı bazı armutların fenolik ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Fantel, A. G., Mackler, B., Stamps, L. D., Tran, T. T. ve Person, R. E. 1998. Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues. **Free Radical Biology ve medicine**, 25, 95–103.
- Fantel, A.G. 1996. Reactive Oxygen Species in Developmental Toxicity: Review and Hypothesis. **Teratology**, 53, 96–217.
- Faydalıoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S. 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik nemi. **Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi**, 11 (1), 52 – 67.
- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., De Takats, P.G., Anderson, D. ve ark. 1996. Phase I clinicaltrial ofthe flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. **Clin. Cancer Res.** 2, 659–668.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. veRitiene, A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 1035-1040.
- Formanek, Z., Kerry, J.P., Higgins, F.M, Buckley, D.J., Morrissey, P.A. ve Farkas, J. 2001. Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. **Meat Science**, 58; 337-341.
- Frankel, E. N. ve Meyer, A. S. 2000. Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 1925–1941.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide Dismutase. **Annual Reviews of Biochemistry**, 44, 147-159.
- Galip, F. 2007. Böğürtlen (*Rubus sp.*) meyvesinin karbondioksit ile süper kritik ekstraksiyonundan doğal boyar madde eldesi ve uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Geibesler, İ.H. 2013. Bingöl ve çevresinde Yetişen ve Tıbbi Değer Taşıyan Bazı Bitki Taksonlarının Fitokimyasal ve BiyolojikAktivitelerinin Araştırılması, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi. Tokat.
- Georgieva, N.V. 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review. **Bulgarian journal of Veterinary Medicine**, 8(1), 1-11.

- Gil, M. I., Tomaäs-Barberaän, F. A., Hess-Pierce, B. ve Kader, A.A. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17), 4976–4982.
- Gök, V. 2006. Antioksidan kullanımının fermente sucukların bazı kalite özellikleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Greenwald, R.A. 1990. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free radical biology ve medicine*, 8, 201-209.
- Groot, H. ve Rauen, M. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental Clinic Pharmacology*, 12, 249-255.
- Grosvenor, P.W., Supriono, A. ve Gray, D.O. 1995. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2, Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 45, 97–111.
- Guo, A., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. ve Jaing, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruit as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.
- Gutteridge, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clinical Chemistry*, 41/12, 1819-1828.
- Gutteridge, J.M.C. 1996. Lipid peroxidation antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistery*, 41, 1819-28.
- Gülçin İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 210–218.
- Gülçin, İ. 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of Ltyrosine and L-Dopa, *Amino Acids*, 32, 431–438.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. 2005. Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas L.*). *Acta Alimentaria*, 34, 193-202.

- Gülçin, İ., Bykokuroğlu, M.E., Oktay, M. veKfrevioğlu, . İ. 2003. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe, ***Journal of Ethnopharmacology***, 86 (1), 51-58.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireci, E. veKfrevioğlu, .İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, ***Food Chemistry***, 83, 371–382.
- Gülçin, İ., Topal, F., ztrk, S.B., Bursal, E., Bilsel, G. veGren, A.C. 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.).***Records of Natural Products***, 5(3), 158-175.
- Gmştaş, M.K. ve Atukeren, P. 2008. Trkiyede karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar. İ.. Cerrahpaşı Tıp Fakültesi Srekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum dizisi No:62 mart İstanbul. S:329-340.
- Haigh, R. 1986. Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. ***Food and Chemical Toxicology***, 24, 1031-1036.
- Halliwell, B. (1994). Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. ***Nutritional Review***, 52, 253-265.
- Halliwell, B. 1999. Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the end (ofthe beginning). ***Free Radical Research***, 31, 261-272.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, 36-245. London, UK.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease. ***Methods Enzymol***, 280, 1-85.
- Halliwell, B. veGutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. ***Biochemical Journal***, 219, 1-4.
- Haugaard, N. 1968. Cellular mekanism of oxygen toxicity. ***Physology Review***, 48, 311-373.
- Hausteen, B. 2002. The Biochemistry and Medicalsignificance of the Flavonoits. ***Pharmacology and Experimental Therapeutics***, 96, 67-202.

- He, X., Li, C., Wei, Z., Wang, J., Kou, J., ve Liu, W. 2016. Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. *European Journal of Pharmacology*. **789**, 215-221.
- Hedge, I. ve Lamond, J. 1982 "Flora of Turkey and East Aegean Islands", Edinburgh, Edinb. Un. Press., Vol. 7, s.264-288. Edinburgh, UK.
- Hedge, I.C. 1992. "A global survey of the Lamiaceae" Advencis in Labiatae **Science**, s: 7-18.
- Heinecke, J.W. 2002. Oxidized amino acids: Culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1090-1101.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M. ve Storey, K.B., 2001. Antioxidant Defenses and Animal Adaptation to Oxygen Availability During Environmental Stress. In: Storey K.B., Storey J.M. (Eds), Cell and Molecular Responses to Stress,. Elsevier Press, 263-287, Amsterdam, Netherlands
- Holloszy, J.O. ve Coyle, E.F. 1984. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *The Journal of Applied Physiology*. 56, 831-838.
- Hu, W., Yu, L., Wang, M.H., 2010. Antioxidant and antiproliferative properties of water extract from *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. leaves. *Food Chem. Toxicol.* 49, 799-806.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53; 1841-1856.
- Imeh, U. ve Khokhar, S. 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (22), 6301-6306.
- Ismail, A., Marjan, Z. M. ve Foong, C. W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87 (4), 581–586.
- Işık, M., Korkmaz, M., Bursal, E., Gülçin, İ., Köksal, E., Tohma, H., (2015). Determination of antioxidant properties of *Gypsophila bitlisensis* Bark. *International Journal of Pharmacology*, 11 (4), 366-371.
- J, Temple. 2000. Antioxidant and disease:More question than answers Norman. *PhD Nutrition Research*, 20, 3.

Kahkonen, MP., Hopia AI. ve Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 4076-4082.

Kalyanaraman, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, 1, 244-57.

Kelen M. ve Tepe B. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. **Bioresource Technology**, 99, 4096-4104.

Keskin, H. 1981. Besin kimyası. İstanbul Üniversitesi, Kimya Fakültesi, İstanbul.

Kılıç, . 2013. A Morphological and Systematical Study on *Nepeta cataria L. (Lamiaceae)* Distributed in the Adıyaman Province. **Iğdır Univ. J. Institı of Science ve Technology**, 3(4), 21-25.

Kılıç, ., Sukru, H., ve Eyup, B. 2011. Chemical Composition of Essential Oil of *Nepeta nuda L. subsp. nuda (Lamiaceae)* from Turkey. **Asian Journal of Chemistry**; 23, 6 , 2788-2790.

Kılınç, K. ve Kılınç, A. 2002. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. **Hacettepe Tıp Dergisi**, 33 (2), 110-118.

Kıral, M. 2012. Turnike uygulanan ortopedi hastalarında İskemi-Reprefzyon hasarı Sonucu oluşan oksidatif hasara karşı C ve E vitamininin koruyucu etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp fakültesi. Ankara.

Kıvçak, B., Mert, T. ve ztrk, H.T. 2002. *Ceratonia siliqua L.* Ekstrelerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29–31 Mayıs, Eskişehir.

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J. ve Lee, C. Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, 50 (13), 3713–3717.

Kintzios SE, Barberaki MG, 2004. Plants that fight cancer. Boca Raton: CRC Press. Washington, D.C. USA.

- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagaoka, S., Takahashi, M. ve Mukai, K. 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1256, 52–56.
- Köktil, G., Sabiha M. Y. ve Gülaçtı, T. 1999. Nepetalactones and Other Constituents of *Nepeta nuda ssp. albiflora*. *Turk Journal of Chemistry*, 23, 99-104.
- Köksal, E. 2007. Purification and characterisation of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea L.*) and determination of their antioxidant and antiradical activities. PhD Thesis, Atatürk University, Erzurum, Turkey.
- Kraehenbuehl, K., Page-Zoerkler, N., Mauroux, O., Gartenmann, K., Blank, I. ve Bel-Rhliid, R. 2017. UPLC-qTOF-MS profiling of pharmacologically important chlorogenic acids and associated glycosides in *Moringa ovalifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany* 108, 193-199
- Krinsky, N.I. 1989. Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617–635.
- Kuntal, M., Kakalı, M., Arunava, G., Haja, N.A., Bishnu, P.S. ve Pulok, K.M. 2005. Enhanced therapeutic benefit of quercetin–phospholipid complex in carbon tetrachloride–induced acute liver injury in rats: a comparative study. *Iranian Journal of Pharmacology Therapeutics*, 4, 84-90.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. ve Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (4), 726–732.
- Larson, R.A. 1998. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969–978.
- Lelli, J.L., Pradhan, S. Ve Cobb, L.M. (1993). Prevention of the postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *Journal of Surgical Research*, 54, 34-38.
- Leong, L. P. ve Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76 (1), 69–75.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 125, 288–306.

- Lian, Z., Nie, H., Xu, Y., Peng, J., Zeng, Z., Wei, Y. ve ark. 2016. Therapeutic effects of rosmarinic acid on airway responses in a murine model of asthma. **International Immunopharmacology**. 41, 90-97.
- Loizzo, M.R., Rashed, K., Said, A., Bonesi, M., Menichini, F., Tundis, R. 2014. Antiproliferative and antioxidant properties of *Alhagi maurorum* Boiss (*Leguminosae*) aerial parts. **Ind. Crops Prod.** 53, 289–295.
- Mahattanatawee, K., Manthey, J.A., Luzio, G., Talcott, S.T., Goodner, K. ve Baldwin, E.A. 2006. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-Grown tropical fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (19), 7355–7363.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessiere, J.M. ve Viano, J. 2003. Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 7115-7121.
- McCord, J. M., 1983. “The superoxid free radical – Its biochemistry and patho-physiology”, **Surgery**, 94 (3), 412-414.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. ve Hadas, S.P. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43,1813-1819.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Derg.**, 15 (1-2), 91-96.
- Miller, D.D. 1996. Mineral. Food Chemistry, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker, 618–649. New York, USA.
- Min DB. 1998. Lipid oxidation of edible oil. In: Akoh K, Min DB, editors. Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Marcel Dekkar; 283–296, New York: USA.
- Mitsuda, H., Yasumoto, K. ve Iwami, K. 1966. Antioxidativ action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyoto Shokuryo**, 19, 210–214.
- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R. ve Vattuone, M.A. 2000. “Comparison of The Free Radical-Scavenging Activity of Propolis from Several Regions of Argentina” **Journal of Ethnopharmacology**, 71, 109–114.

6. KAYNAKLAR

- Moure, A., Cruz, JM., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J. ve Dominguez, H., 2001. Natural antioxidants from residual source. **Food Chemistry**, 72, 145.
- Müftüoğlu, O. 2003. Yaşasın Hayat, Doğan Kitapçılık, İstanbul.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York. USA.
- Niksic, H., Besovic, E.K., Makarevic, E., Duric, K. 2012. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mentha longifolia* (L.) Huds. essential oil. **Journal of Health Sciences**.2(3), 192-200.
- Nordberg, J., ve Arner, E.S.J. 2001. Reactive Oxygen Species, antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. **Free Radical Biological Medicine**, 31, 1287–1312.
- Oyaizu, M. 1986. “Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine”, **Japanise Journal of Nutrition**, 44, 307-315.
- Öz, S. ve Dirmenci, T. 2004. Endemik *Nepeta Nuda* L Subsp. *Lydiae* Ph Davis Alt Türünün Morfoloji ve Karyolojisinin İncelenmesi. **BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi**6.1
- Özcelik, B., Lee, J.H. ve Min, D.B. 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. **Journal of Food Science**, 68, 487–490.
- Pacific, R.E. ve Davis, K.J.A. 1991. Protein, lipid and DNA repair system in oxydative stress: the free radical theory of aging revisited. **Gerontology**, 37, 166-180.
- Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S., Marciano, S., Bauer, R. ve Monaco, P. 2015. Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. **Food Research International** 69, 121-132.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H. ve ark. 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, 22, 18–35.
- Pehlivan, M. ve Güleriyüz, M. 2004. Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. **Bahçe**, 33(1-2), 51-57.

- Percival, M. 1996. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 96, 1-4.
- Pereraa, H.D.S.M, Samarasekeraa, J.K.R.R., Handunnetti, S.M., Weerasena O.V.D.S.J. 2016. vitro anti-inflammatory and anti-oxidant activities of Sri Lankan medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 94, 610–620.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, E., Serrano, J., Goñi, I. ve Saura-Calixto, I. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285.
- Pinchuk, I. ve Lichtenberg, D. 2002. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progress in lipid research*, 41, 279-314.
- Pratt, D, E. ve Hudson, B.J.F. 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants. Hudson B.J.F, Ed.; 17-192, Elsevier; Amsterdam, Netherlands
- Rahman, A., Hussain, S., Millat, S., Chandra, R.M., Tohidul A.M. ve Rahman, M.M. (2016). Screenings of In-vitro antimicrobial, cytotoxic and antiinflammatory activity of crude methanolic extracts of *Crinum latifolium* (Leaves). *Journal of Medicinal Plants Research*. 10(37).
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., 1999. “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical, Biology ve Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.
- Reddy C. V. K., Sreeramulu, D. ve Raghunath, M. 2010. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43 (1), 285-288.
- Rhee, S.G. 1999. Redox Signaling: Hydrogen Peroxide as Intracellular Messenger. *Exp. Mol. Med.*, 31, 53-59.
- Rice-Evans, CA., Miller, NJ. ve Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Roginsky, V. ve Lissi, E.A. 2005. Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. *Food Chemistry*, 92, 235–254.

- Rucker, RB. ve Steinberg, F. 2004. Vitamin C. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 4, 367-371.
- Runyoro D, Matee M, Olipa N, Joseph C, Mbwambo H 2006. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC Complement Altern. Med.* 6,11.
- Sahaidi, F., Janitha, P.K. ve Wanasundara, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Saleem, M. 2000. Chemical and biological screening of some relatives of *Laminaceae* (*Labiatae*) family and marina algae *Conidium iyengarii*. P.H.D. Thesis University of Karachi, Karachi.
- Schultz, G., Simbro E., Belden J., Zhu J. ve Coats J., 2004. Catnip, *Nepeta cataria* (*Lamiales: Lamiaceae*)- A Closer Look: Seasonal Occurrence of Nepetalactone Isomers and Comparative Repellency of Three Terpenoids to Insects. *Environ. Entomol.* 33(6), 1562-1569.
- Sekar, S., Kandavel, D. 2010. Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria(PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants. New Avenues for Phytochemicals. *J. Phytology*. 2, 91-100.
- Sen, Ck. 2001. Antioxidant And Redox Regulation Of Cellular Signaling: Introduction. *Medicine Science in Sports Exercise*, 33, 368–70.
- Serafini, M. ve Del Rio, D. 2004. Understanding the Association Between Dietary Antioxidants, Redox Status and Disease: Is the Total Antioxidant Capacity the Right Tool?. *Redox Report*, 9 (3), 145-152.
- Shahidi, B.H. 2004. Evaluation of antimicrobial properties of Iranian medicinal plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumonia* and *Bordetella bronchoseptica*. *Asian J. Plant Sci.* 3,82-6.
- Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F. ve Larondelle, Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101 (3), 1012-1018.
- Siriwardhana, N., Lee, K.W., Jeon, Y.J., Kim, S.H., Haw, J.W., 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Tech. Int.* 9, 339–346.

- Sise, H. 1997. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stres: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, 82, 291-295.
- Soycan, .S., Aıkgz, Z. 2005. Aromatik Bitkilerin Hayvansal rnlerde Antioksidan Etkileri. **Hayvansal retim**, 46(1), 50-55.
- Stadman, E.R. 2002. İmportance of individuality in oxidative stres and aging **Free Radical Biology ve Medicine**, 33(5), 597–604.
- Stevenson, D.E.,ve Hurst, R.D. 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 64, 2900-2916.
- Şerbetçi, H. 2007. Meyan(*Glycyrrhiza glabra L.*) bitkisinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisns Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi No: 96, Sahin Matbaası, 216-228 s, Ankara.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. ve Byrne, D. H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19 (6-7), 669–675.
- Todorov, D., Shishkova, K., Dragolova, D., Hinkov, A., Kapchina-Toteva V., and Shishkov, S., 2015. Antiviral activity of medicinal plant Nepeta nuda. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 29(1), 39-43.
- Tohma, H., Koksall, E., Kilic, O, Alan, Y., Yılmaz, M.A., Gulcin, I, Bursal, E., Alwasel, S. 2016. RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of Salvia L. species. **Antioxidants**, 5 (4), 38.
- Ueda, J., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Tran, Q., Harimayay, S. (2002). Antiproliferative activity of vietnamese medicinal plants. **Biol. Pharm. Bull.** 25,753-60
- Üstün, . 1998. Santral Sinir Sistemine Etkili Tıbbi Bitkilerin Tarihsel Süreç İçinde ve Günümüz Tedavisindeki Yeri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Valko, M., Leibfritz, D., Monocol, J., Corinin, M. ve Mazur, M. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. ***The International Journal of Biochemistry ve Cell Biology***, 39, 44-84.
- Vinokur, Y., Rodov, V., Reznick, N., Goldman, G., Horev, B., Umiel, N. ve Friedman, H. 2006. Rose petal tea as an antioxidant-rich beverage: Cultivar effects. ***Journal of Food Science*** 71 (1), 542–547.
- Volkman, C., Hartjen, U., Zeeck, A., Fiedler, H.P. ve Naphthgeranine, F. A 1995. Minor Congener of the Naphthgeranine Group Produced by *Streptomyces violaceus*. ***The Journal of Antibiotics***, 48, 522–524.
- Waddington, R.J., Moseley, R., Embury, G. 2000. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. ***Oral Diseases***, 6,138-151.
- Wickens, A.P. 2001. Ageing and Free Radical Theory. ***Respiration Physiology***, 128, 379–391.
- Yılmaz, 2011. *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* bitirinin antioksidan ve anti-Alzheimer bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının belirlenmesi. İstanbul Teknik üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U., Kandemir, A., Ayyıldız, A. 2003. Bazı Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma. ***Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg.*** 33, 269-272.
- Žugić, A., Đorđević, S., Arsić, I., Marković, G., Živković, J., Jovanović, S., ve Tadić, V. 2014 Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. ***Industrial Crops and Products***. 52, 519-527.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Solhan'da doğdu. İlköğretimini solhan'da Liseyi Elazığ'da tamamladı. 2001 yılında Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2005 yılında mezun oldu. 2008 yılında Kafkas Üniversitesinde tezsiz yüksek lisansını tamamladı. 2012 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Organik Kimya Bölümünde “Bazı 4-(3-metoksi-4-asetoksi)benzilidenamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on türevlerinin sentezi ve in-vitro antioksidan özelliklerinin incelenmesi” konulu tezini tamamlayarak mezun aldı. 2012 yılında Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya programına doktora eğitimine başladı. Halen Sosyal Yardımlaşma ve Dayanışma Vakfında vakıf görevlisi olarak çalışmakta olup, evli ve bir çocuk babasıdır.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Aras, A., Bursal, E., Doğru, M. (2016). UHPLC-ESI-MS/MS analyses for quantification of phenolic compounds of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 6(11): 009-013.

Aras, A., Doğru, M., Bursal, E. (2016). Determination of antioxidant potential of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. Analytical Chemistry Letters. Accepted.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

Aras, A., Bursal, E., Doğru, M. Determination of free oxygen radical scavenger activities and phenolic contents of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. 6. Oksidatif Stress, Kalsiyum Kanalları ve TRP Kanalları Dünya Kongresi. 24-27 Mayıs 2016, Isparta. P124.



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU
FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ADI VE SOYADI	ABDÜLMELİK ARAS
ÖĞRENCİ NO	12803504
EĞİTİM - ÖĞRETİM YILI	2016-2017
YARIYIL	☒ Güz ☐ Bahar
ANABİLİM DALI	KİMYA
PROGRAM	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐ Tezsiz Yüksek Lisans (Dönem Projesi)

TEZ KONUSU
TÜRKİYE'DE YETİŞEN ENDEMİK (Nepeta nuda subsp. lydiae) BİTKİSİNE AİT FARKLI EKSTRELERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞİK İÇERİKLERİNİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ

İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ

RAPOR TÜRÜ	☐ Tez Savunma Sınavı Öncesi ☒ Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	90
BENZERLİK ORANI	%16
RAPORLAMA TARİHİ	23.01.2017

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 72 sayfalık kısmına ilişkin, 23.01.2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *İTHENTICATE* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 16 'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☒ Kabul/Onay sayfaları hariç,
- ☒ Kaynakça hariç
- ☐ Alıntılar hariç/dâhil
- ☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Cereğini saygılarımla arz ederim.

Abdülmelik ARAS

23.01.2017
Prof. Dr. Mehmet DOĞRU
Tez Danışmanı

23.01.2017
Prof. Dr. Çiğdem YAYUZ
Anabilim Dalı Başkanı