



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

**[PEROKSİL RADİKAL SÜPÜRME ETKİNLİĞİ ÖLÇÜMÜ İÇİN
ALTIN NANOKÜME ESASLI YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ]**

[Herbert Cirrus KABOGGOZA]

**[DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKDESER]**

[Kimya Anabilim Dalı]

[Analitik Kimya Programı]

[İSTANBUL-2020]

Bu çalışma, 17.08.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKDESER (Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Nilay BEĞİÇ
Biruni Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



[20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.]

ÖNSÖZ

[Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın am Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKDESER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK içten teşekkür ederim.

Yorucu ve uzun süren çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen ve özellikle üzerimde emeği olan ve çalışmaların boyunca destek olan değerli hocalarım Dr.Öğr.Üyesi Mustafa BENER'e, Dr.Öğr.Üyesi Saliha Esin ÇELİK'a gönülden teşekkür ederim.

Bilimsel ve akademik kariyerine saygı duyduğum sayın Analitik Kimya Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürimde yer alan Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a ve Dr.Öğr. Üyesi Nilay BEĞİÇ'e teşekkürlerimi sunarım

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Doktor öğrencisi Furkan Burak ŞEN'e ayrıca teşekkür ederim.

Eğitime ve bilime destekleri ile tanınan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na gençlere olan güvenleri ve burs desteklerinden dolayı takdir ve teşekkürlerimi sunarım

Eğitimim konusunda beni cesaretlendiren, bana güvenen ve yanımda olmasalar da manevi desteklerini sunan aileme teşekkür ederim |

Ağustos 2020

[Herbert Cirrus KABOGGOZA]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1 MOLEKÜLER OKSİJEN VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ.....	4
2.2 PEROKSİL RADİKALİ	7
2.2.1 Peroksil Radikalinin Reaktivitesi	7
2.2.2 Peroksil Radikal Oluşumu	8
2.3.1 İyodometrik Yöntemi	11
2.3.2 TBARS Yöntemi	12
2.3.3 FOX ve FTC Yöntemi	12
2.4 NANOPARTİKÜLLER	13
2.4.1 Altın nanoparçacıklar	13
2.5 NANOKÜMELER.....	14
2.5.1 Altın Nanokümelere	16
2.5 PEROKSİL RADİKAL DEDEKSİYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	18
2.5.1 ORAC Yöntemi	18

2.5.2 TRAP Yöntemi.....	20
2.5.3 PABA Yöntemi	21
2.5.4 Krosin Ağartma (Beyazlatma) Yöntemi.....	22
2.5.5 Nanosensor Esaslı Peroksil Radikal Süpürme Aktivite Yöntemi.....	23
2.6 PEROKSİL RADİKAL SÜPÜRME AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI YÖNTEM.....	24
3 MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1 MALZEME	25
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	25
3.1.2 Kimyasal maddeler.....	25
3.2 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	26
3.2.1 Altın Nanoparçacık Esaslı Peroksil Radikal Süpürme Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.2.2 Krosin Ağartma Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.2.3 Peroksil Radikal Süpürücü Bileşiklerin Hazırlanması	26
3.3 PEROKSİL RADİKAL SÜPÜRME AKTİVİTE TAYİNİNDE UYGULANAN YÖNTEMLER	27
3.3.1 Peroksil Radikali Üretimi	27
3.3.2 Altın Nanoparçacık Esaslı Peroksil Radikal Süpürme Aktivite Tayin Yöntemi	27
3.3.3 AuNP Probuna Ait İntensite Değerlerinin İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Değişimi.....	28
3.3.4 Krosin Ağartma (Beyazlatma) Yöntemi.....	28
3.3.5 AuNP Probunun Seçicilik Ölçümü.....	29
3.3.6 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	30

4 BULGULAR.....	31
4.1 ÖNERİLEN AUNP PROBU VE OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ	31
4.1.1 AuNP Probu'nun Özellikleri.....	31
4.1.2 İnkübasyon Süresi	32
4.2 ÇEŞİTLİ SÜPÜRÜCÜ BİLEŞİKLERİN PEROKSİL RADİKALİ SÜPÜRME AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ.....	33
4.2.1 Peroksil Radikal Üretim Sistemi ile AuNP Probu Arasındaki Etkileşim.....	33
4.2.2 Krosin Ağartma Yöntemiyle Çeşitli Süpürücü Bileşiklerin IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.....	35
4.2.3 Bazı Gerçek Örneklerin Peroksil Radikali Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	37
4.2.4 Önerilen AuNP Probu'nun Seçiciliği	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR.....	46
EKLER	53
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1: HAuCl ₄ ve histidinin karıştırılmasıyla hazırlanan AuNP GSH ekleyerek ligand değişimi.	3
Şekil 2.1: Moleküler oksijenin kovalent bağı	4
Şekil 2.2: Moleküler oksijenin diatomik doğası ve enerji diyagramı	5
Şekil 2.3: Peroksil radikalının yapısı.	7
Şekil 2.4: AAPH'in (a), ABAP'in (b) ve AMVN'in (c) kimyasal yapısı	9
Şekil 2.5: AAPH'in termal bozunması sonucu oluşan peroksil radikali.....	9
Şekil 2.6: Analiz örneğinin eğri altında kalan alan (AUC).	20
Şekil 3.1: AAPH'in termal bozunması sonucu peroksil radikal oluşumu	27
Şekil 4.1: Altın nanoparçacık probunun tek başına (a: 500 nm; b: 3 µm) ve peroksil radikalleri varlığında (c: 3 µm) elde edilen TEM görüntüleri	31
Şekil 4.2: (a) AuNP probunun tek başına, (b) süpürücü bileşik (kateşin) varlığında ve (c) yokluğunda (referans) inkübasyon süresine bağlı olarak intensite değerlerinin değişim grafiği.	32
Şekil 4.3: AuNP probunun farklı karışımların emisyon spektrumları; (a) AuNP probu tek başına, (b) AuNP + 66.6 µM CAT, (c) AuNP + 66.6 µM CAT + 2µM AAPH, (d) AuNP + 0.3mL 20mM AAPH, and (e) 66.6 µM CAT and 2µM AAPH.	33
Şekil 4.4: Peroksil radikali varlığında ve yokluğunda (a) AuNP probu tek başına, (b) 227 µM CAT, (c) 160 µM CAT, (d) 107 µM CAT, (e) 53.3 µM CAT, (f) 13.3 µM CAT and (g) 0 µM CAT (referans) AuNP probunun emisyon-floresans spektrumları.	34

Şekil 4.5: Krosin yöntemine göre Peroksil radikali varlığında ve yokluğunda; (a) krosin sadece, (b) 8 μM CAT, (c) 7 μM CAT, (d) 5 μM CAT, (e) 3 μM CAT, (f) 1 μM CAT) ve (g) 0 μM CAT (referans) elde edilen görünür alan spektrumları.	35
Şekil 4.6: 1:40 oranında seyreltilmiş yeşil çayı (a) ve ada çayı (b) ekstralarının % inhibisyon değerleri ile ekstrakt hacmi arasındaki ilişki.	38
Şekil 4.7: AuNP esaslı florimetrik yöntem ve Krosin yöntemine göre 1:40 oranında seyreltilmiş 0.5 ml yeşil çay ve ada çay ekstralarının % inhibisyon değerleri.	38
Şekil 4.8: AuNP esaslı florimetrik yöntem ile kateşin katkılı ve katkısız sentetik serum örneğinin peroksil radikal süpürme aktivitesi; (a) 0.5mL 1:20 seyreltilmiş sentetik serum örneğine kateşin ($4 \times 10^{-4}\text{M}$) katkılı, (b) Sentetik serum (1:20).	39
Şekil 4.9: AuNP probunun çeşitli reaktif oksijen türleri varlığında floresan intensitesindeki değişim. Ortalama \pm SD (n=3).	40
Şekil 5.1: HAuCl_4 ve histidinin karıştırılmasıyla hazırlanan AuNP'in GSH ile fluoresan artışının gösterilmesi.	43

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.	6
Tablo 2.2: Tek atom, kümeler ve nanopartiküllerin geometrik ve elektronik yapılarını karşılaştırılması.....	15
Tablo 4.1: AuNP esaslı florimetrik yönteme ait % İnhibisyon – C_{CAT} değerleri ve doğru denklemi	34
Tablo 4.2: % İnhibisyon – C_{CAT} değerleri ve doğru denklemi	36
Tablo 4.3: AuNP esaslı yöntem ve Krosin yöntemi ile elde edilen çeşitli süpürücü bileşiklerin PSC değerleri ($N= 5$ veya 7).....	37

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
A	: Absorbans
C	: Konsantrasyon
I	: Floresans intensitesi
IC₅₀	: %50 inhibe edici konsantrasyon
r	: Lineer korelasyon katsayısı
SD	: Standart sapma
V	: Hacim
λ_{em}	: Maksimum dalga boyu

Kısaltmalar	Açıklama
AAPH	: 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorür
AH	: Antioksidan
AuNC	: Altın nanokümelere
AuNP	: Altın nanoparçacıklar
CAT	: Kateşin
EC	: Epikateşin
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin gallat
FOX	: Demir Oksidasyonu/Xylenol Turunc Yöntemi
FRAP	: Ferulik asit
FTC	: Ferrik Tiyosiyanat Metodu
GSH	: L-glutasyon
HAT	: Hidrojen atomu transfer
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LMNCT	: Ligandlardan metal Merkez şarj transferi
LOO[•]	: Lipid peroksil radikali
LOOH'ler	: Lipid hidroperoksitler
MAE	: Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi
MDA	: Malondialdehit

NC	: Nanokümeler
Net AUC	: Eğri altında kalan alan
NP	: Nanopartiküller
ORAC	: Oksijen radikal absorbans kapasitesi yöntemi
PA	: Protokateşik asit
PABA	: P-aminobenzoik asidin
PE	: R-phycoerythrin
PSC	: Peroksil Radikal Süpürme Aktivitesini
PUFA'lar	: Doymamış yağ asitleri
QR	: Kuersetin
RA	: Rosmarinik asit
RH	: Peroksil radikalinin hedef molekül
ROO•	: Peroksil radikali
ROOH/LOOH	: Hidroperoksit
TBA	: Tiobarbitürik asit
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TRAP	: Toplam peroksil radikal yakalama

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[PEROKSİL RADİKAL SÜPÜRME ETKİNLİĞİ ÖLÇÜMÜ İÇİN ALTIN NANOKÜME ESASLI YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ]

[Herbert Cirrus KABOGGOZA]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

[Kimya Anabilim Dalı]

[Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKDEŞER]

[Moleküler oksijen metabolizmada çok önemli bir rol oynamasına rağmen, bir radikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. ROS oldukça kararsız ve yüksek reaktif maddelerdir ve radikalik ve radikal olmayan ROS olarak sınıflandırılmıştır. Vücut hücrelerinde, bu türlerin olumsuz etkilerini nötralize etmek için enzimatik, enzimatik olmayan veya diyet kökenli olabilen doğal savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Fakat, ROS'un aşırı üretimi etkisiyle, "oksidatif stress" denilen bir durumda, makromoleküllere saldırılmaktadır. Özellikle, peroksid radikal reaktivitesi nedeniyle lipid, protein ve nükleik asitlerde hasara yol açabilmektedir. Peroksid radikal önemli bir ROS, çünkü oluşumu lipid peroksidasyonunda önemli bir zincir yayılım adımıdır. Lipid peroksidasyonu, membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri ciddi hasara neden olan çok ciddi bir yıkıcı oksidatif süreçtir.

Peroksid radikal süpürme aktivitesini ölçülen mevcut yöntemler, çok zahmetli olan hidrojen atomu transfer reaksiyonlarına dayanmaktadır. Bu nedenle, peroksid radikal süpürme

aktivitesini ölçmek için daha kolay ve daha hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında, literatürde mevcut olan yöntemlerin çeşitli sınırlamalarını ortadan kaldıran altın nanoküm esaslı spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir.

Histidin ve glutatyon (GSH) kullanılarak çevre dostu bir yöntemle hızlı, seçici, kararlı ve florimetrik altın nanoparçacık probu sentezlenip çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikali süpürme aktiviteleri başarılı şekilde değerlendirildi. Literatürde mevcut olan krosin yöntemi referans yöntem olarak kullanıldı. Çalışılan antioksidan bileşikler arasında hem geliştirilen hem de referans yöntem ile en düşük IC_{50} değeri epigallo kateşin gallat (EGCG) için bulunurken en yüksek IC_{50} değeri ferulik asit için hesaplandı. Geliştirilen altın nanoparçacık esaslı yöntemle göre, 4.20 ± 0.19 ve 427.59 ± 10.78 sırasıyla EGCG'nin ve ferulik asit'in IC_{50} değerleridir.

|
[Ağustos 2020], [70] sayfa.

Anahtar kelimeler: | Peroksil Radikal Süpürme Aktivitesini, Nanopartiküller, Peroksil Radikali, L-glutatyon, ve Histidin. |

SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

[DEVELOPMENT OF GOLD NANOCCLUSERS BASED-ASSAY FOR MEASURING PEROXYL RADICAL SCAVENGING ACTIVITY]

Herbert Cirrus KABOGGOZA]

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

[Department of Chemistry]

Supervisor : [Assoc. Prof. Dr.]Burcu BEKDESER]

In as much molecular oxygen plays a crucial role in metabolism, due to its diatomic nature it can undergo reduction to form Reactive Oxygen Species (ROS). ROS are highly unstable and reactive metabolites and classified as radical and non-radical ROS. Body cells have natural defence mechanisms be it enzymatic, nonenzymatic or dietary origin to neutralize counteract the negative effects of these species. However, in the event of excessive production of the ROS, a condition called oxidative stress, these species attack macromolecules. In particular the peroxy radical causes damage to lipids, proteins and nucleic acids due to its unique reactivity. The peroxy radical is a significant ROS because its formation is a major chain-propagation step in lipid peroxidation. Lipid peroxidation is a serious oxidative process which causes severe damage to polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in cell membranes.

The current methods for determining the peroxy radical scavenging activity are based on hydrogen atom transfer reactions that are very troublesome. Therefore, there is still need for

easier and more sensitive methods for measuring the peroxy radical scavenging activity. Within the scope of this thesis, a spectrophotometric method based on AuNPs has been developed eliminating several limitations of the methods literature.

An environment friendly, faster, highly selective and stable fluorimetric gold nanoparticle probes were synthesized by blending HAuCl₄, histidine and glutathione (GSH) and used for evaluating the peroxy radical scavenging activity of various antioxidant compounds. The Crocin method available in literature was applied as the reference method. Among the antioxidant compounds studied, the lowest and highest IC₅₀ value was found for epicatechin gallate (EGCG) and ferulic acid respectively. According to the developed AuNPs based method, the IC₅₀ values of EGCG and ferulic acid were 4.20±0.19 ve 427.59±10.78 respectively.

|
[August 2020], 70 pages.

Keywords: Peroxyl Radical Scavenging activity, Nanoparticles, Peroxyl Radical, Glutathione and Histidine.

1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROS), oksijen içeren ve bir hücredeki diğer moleküllerle kolayca reaksiyona giren kararsız molekül türleri olup insan vücudundaki savunma sisteminde mühim rol oynamaktadır. Bununla birlikte ROS'un aşırı üretimi etkisiyle ve antioksidan savunma sisteminin zayıflamasıyla hücrelerde reaktif oksijen türleri biriktirip DNA, RNA ve proteinler gibi makromoleküllere zarar verip hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle ateroskleroz, kanser, nörolojik dejenerasyon gibi farklı hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır [1].

Hücrelerde ve hücreyel makromoleküllerde ciddi hasara yol açan lipid peroksidasyonu sırasında serbest oksijen grupları çok etkin şekillere dönüşmektedir. Bununla birlikte doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarak lipid radikali meydana gelmektedir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girip ROS'lerinden biri olan ve en yıkıcı olan ve lipid peroksi radikalini oluşturmaktadır. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve hücreyel düzeyde zehirleyici etkinin en önemli kısmını oluşturan lipid hidroperoksitler (LOOH) oluşmaktadır. Lipid oksidasyonu çok ciddi bir yıkıcı süreçtir, çünkü bu hasar, daha reaktif yağlı aldehit türlerinin oluşturmasıyla daha da güçlendirmektedir. Fosfolipitlerin zarlarındaki doymamış yağ asidi zincirlerinin parçalanması ve plazma veya hücre zarında oluşan bozulmalar sonucu olmaktadır [2]. Bu sebeple biyolojik sistemde, ROS türlerini özellikle de peroksil radikali süpürme özelliklerini değerlendirmek için analitik kimyada basit, kullanışlı, hızlı, ucuz ve duyarlı radikal süpürme aktivite tayin yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda tez kapsamında peroksil radikali süpürme aktivitesini belirlemek için florometrik altın nanoparçacık esaslı yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

ROO' biyokimya, gıda ve çevre gibi bilim alanlarında önemli olduğu için, peroksil radikali süpürme aktivitesini (PSC) değerlendirmek için çeşitli yöntemlerinin geliştirilmesine çok çaba gösterilmektedir. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC), PSC değerlendirmek için yöntemlerinden en yaygın kullanılanlardan biridir. Bu yöntem peroksil radikal süpürme kapasitesini ve peroksil radikale karşı antioksidan aktiviteyi incelemek için yaygın olarak uygulanmıştır çünkü hem inhibe etme yüzdesini ve hem de inhibe etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [3].

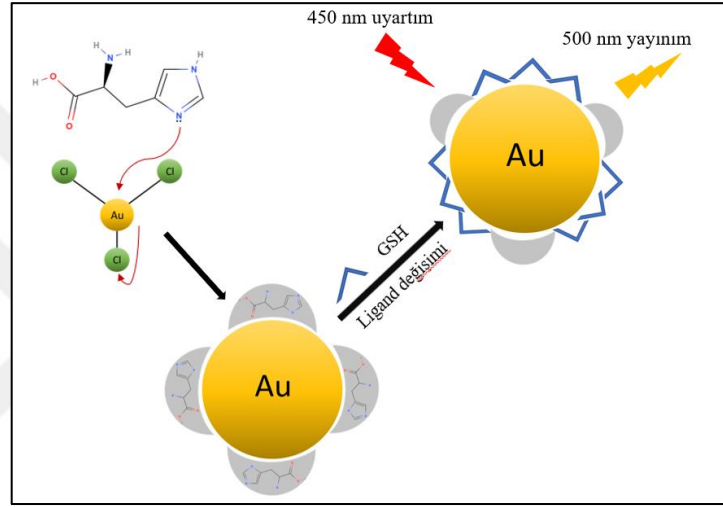
β -fikoeritrin (β -PE) peroksil radikal süpürme aktivitesini belirlenmek amacıyla ilk kullanılan probtur. Ne yazık ki, β -PE'in çeşitliliğinin çok fazla olmasından kaynaklı floresans kayıpları gibi olumsuzluklarından dolayı floressein (FL) gibi başka alternatifleri ortaya çıkmaya başlamıştır [4]. ORAC dışında krosin ağartma (beyazlatma) yöntemi, peroksil radikal süpürmesini incelemek için antioksidanların peroksil radikalinden kaynaklanan krosinin oksidasyonunu önlemesine dayanmaktayken toplam radikal yakalama antioksidan parametre (TRAP) yöntemin toplam peroksil radikal yakalama potansiyeline (TRAP) dayanmaktadır. Peroksil radikal süpürücü aktivitesi de Güçlü ve arkadaşların (2014) tarafından geliştirilen florimetrik yöntemde p-aminobenzoik asidin (PABA) prob olarak kullanılmıştı [5]. Floresansa dayalı probular daha tercih etmektedir çünkü veri toplamadaki üstün duyarlılığı, seçiciliği ve sadeliğine sahiptir. Ayrıca floresans yöntemlerinde, basit ve kullanımı kolay olan enstrümanlar gerekmektedir, üstelik bu yöntemde analiz altındaki numuneye zarar verilmemektedir.

Genel olarak literatürde mevcut olan yöntemler, sıkı çalışma koşullarında gerçekleşen gibi her birinin kendilerine özgü çeşitli kısıtlamaları bulunmaktadır ve çok zahmetli olan hidrojen atomu transfer reaksiyonlarına dayanmaktadır [6]. Bu nedenle, bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için peroksil radikal süpürme aktivitesini ölçmek için daha kolay ve daha hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boşluğu doldurabilmek için nanosensor esaslı peroksil radikal süpürme aktivite yöntemleri potansiyele sahiplerdir.

Son on yılda, nanoteknoloji, bilim ve teknolojik uygulamalarının pek çok alanını kapsayan oldukça umut ve heyecan verici, yenilikçi ve çeşitli bilimsel alanlarda ilginç bir araştırma konusu olmuştur [7]. Özellikle de AuNP, optik özellikler, elektronik özellikler, geniş yüzey-hacim oranı, mükemmel biyoyumluluk ve düşük toksisite boyutuna ve şekline bağlı olan olağanüstü özelliklere sahiptir [8]. AuNP kullanılarak Çelik ve diğerleri tarafından hidroperoksidlerin iyodürü yüksetgeme yeteneğinden yararlanarak hem hidroperoksidlerin tayini hem de antioksidan karakterli bileşiklerin peroksil radikali süpürme etkinliğini ölçmek için nişasta stabilize AuNP kolorimetrik nano-sensör geliştirilmiştir [9].

Bu tez kapsamında, yukarıda vurgulanan veya literatürde mevcut olan yöntemlerin çeşitli sınırlamalarını ortadan kaldıran altın nanoparçacık esaslı spektroflorometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikal süpürme

aktiviteleri hesaplanmış ve referans yöntem olarak seçilen Krosin Ağartma Yöntemi'nden elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Bu önerilen yöntem ile peroksil radikal süpürmeye dayalı antioksidan aktivite tayini için seçici, hassas ve kararlı bir altın nanoparçacık prob kullanılarak mevcut yöntemlerden daha avantajlı bir yöntem literatüre sunuldu. Güçlü Au-S bağının bir sonucu olarak ortama eklenen GSH'nın Au NC'lerin yüzeyinde bulunan histidin molekülleri ile kademeli olarak bir ligand değişimine yol açarak [10] AuNP'nin floresans şiddetindeki önemli artışın görünmektedir.



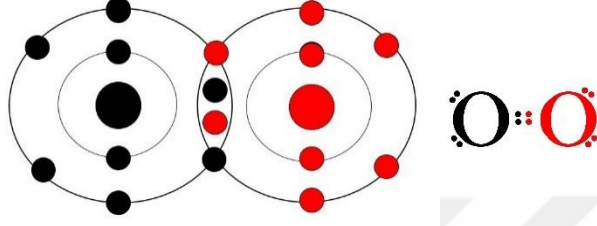
Şekil 1.1: H_{Au}Cl₄ ve histidinin karıştırılmasıyla hazırlanan AuNP GSH ekleyerek ligand değişimi.

Peroksil radikal süpürme aktivite tayini için prob olarak kullanılan altın nanoparçacıkların eksitasyon (uyarım) ve emisyon (yayınım) dalgaboyları sırasıyla 450 nm ve 500 nm olarak belirlenmiştir. |

2. GENEL KISIMLAR

2.1 MOLEKÜLER OKSİJEN VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

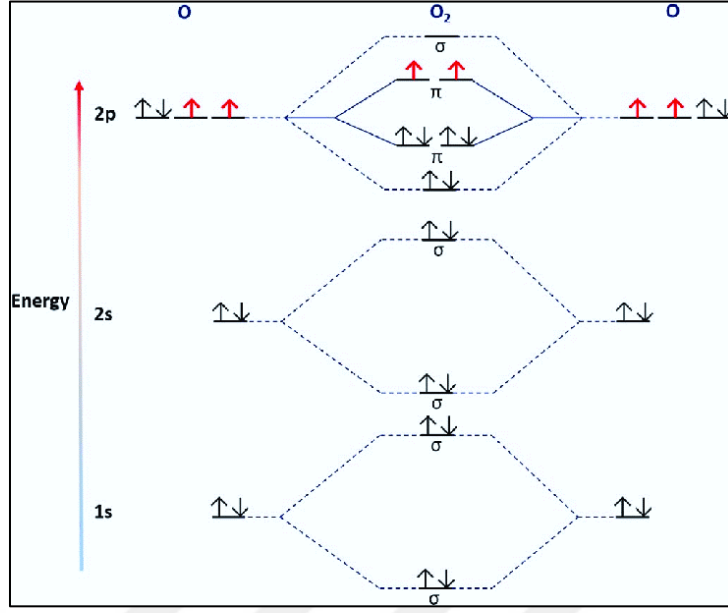
Moleküler oksijen (O_2), bir kovalent bağ tarafından bir arada tutulan iki oksijen atomundan oluşan iki atomlu bir moleküldür (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Moleküler oksijenin kovalent bağı

Moleküler oksijen, çoğu yaşam formlarının devam etmesi için gerekli en önemli metabolitlerinden biridir. Çünkü taşıdığı rolü nedeniyle oksijen hayati bir öneme sahiptir. Oksijen aerobik hücrelerinde enerji metabolizma süreci (aerobik metabolizması) sırasında salınan elektronlar için son bir elektron alıcısı olmaktadır [2].

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal olarak değerlendirilir. Diatomik moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu herbiri farklı n^* antibağ orbitaline yerleşmiş iki eşleşmemiş elektrona sahiptir (Şekil 2.2). Moleküler oksijen metabolizmada çok önemli bir rol oynamasına rağmen, diatomik doğası nedeniyle, oksidasyon ve fiziksel aktivasyon (radyasyon) gibi işlemler yoluyla indirgenmektedir.



Şekil 2.2: Moleküler oksijenin diatomik doğası ve enerji diyagramı

Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. “Reaktif oksijen türleri (ROS)” oldukça kararsız ve yüksek reaktif maddelerdir ve peroksil radikal (ROO^{\bullet}), süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet -}$) ve hidroksil radikal ($^{\bullet}\text{OH}$) gibi radikalik ve hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen, hipokloroz asit (HOCl) ve hipobromöz asit (HOBr) gibi radikal olmayan ROS olarak sınıflandırılmıştır. Serbest radikaller dış yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulunduran atom, atom grubu veya moleküllerdir. Bu eşlenmemiş elektron nedeniyle kararsız yapıda bulunan serbest radikal molekülü, kararlı hale geçebilmek için elektronunu başka bir elektron ile eşleştirmesi gerekmektedir. Bu nedenle de serbest radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir oldukça aktif moleküllerdir.

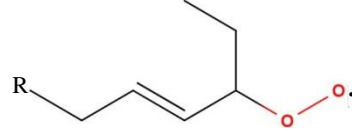
Tablo 2.1: Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.

Radikalik türler	Radikal olmayan türler
Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)	Hidrojen peroksit
Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Hipokloroz asit (HOCl)
Hidroperoksil ($\text{HO}_2\cdot$)	Hipobromoz asit (HOBr)
Peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$)	Ozon (O_3)
Alkoksi radikali ($\text{RO}\cdot$)	Singlet oksijen ($\text{O}_2^1\Delta\text{g}$)
	Peroksinitrit anyonu (ONOO^-)
	Peroksinitroz asit (ONOOH)

Farklı ortamlarda çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar ile oluşan radikaller kontrol altında tutulmazlarsa reaktiviteleri nedeniyle lipid, protein ve nükleik asitlerde hasara yol açabilmektedir. Vücut hücreleri, bu türlerin olumsuz etkilerini nötralize etmek için enzimatik, enzimatik olmayan veya diyet kökenli olabilen doğal savunma mekanizmalarına sahiptir. Ancak, “oksidatif stress” denilen bir durum olan ROS'un aşırı üretimi etkisiyle, bu türler DNA, lipidler, nükleik asitler ve hücre zarı bileşenleri gibi makromoleküllere saldırmaktadır. Bu oksidatif hasar olarak adlandırılmıştır ve hücre yaşlanmasının, kardiyovasküler hastalıkların, mutajenik geri dönüşümsüz değişikliklerinin, kanserli tümör hücrelerinin ve hücre ölümünün sebebi olmaktadır. Oksijen sadece aerobik türlerde değil, oksijene bağımlı olmayan canlılarda da toksik etkilidir. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda da savunma sisteminin bulunmamasıdır.

2.2 PEROKSİL RADİKALİ

Peroksil radikali (ROO^\bullet), organik bir grubun (R) hidrojen atomu (H) yerine aldığı hidroksil radikal (HOO^\bullet)'ya göre karşılaştırılabilir. Peroksil radikal (ROO^\bullet) genellikle gıdalarda ve biyolojik örnekler içerisinde bulunmaktadır. ROO^\bullet , nanosaniye yerine yarı ömürlü saniyeler olduğu için diğer ROS'a göre nispeten daha kararlı ve daha az reaktiftir.



[Şekil 2.3: Peroksil radikalinin yapısı.]

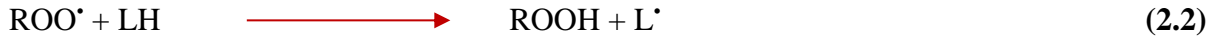
2.2.1 Peroksil Radikalinin Reaktivitesi

Tıpkı herhangi bir radikal gibi peroksil radikalinin başlıca tepkimeleri aşağıda verilmektedir.

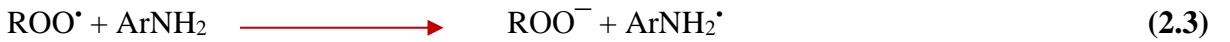
Katılma Reaksiyonu



Hidrojen Çıkarma Reaksiyonu



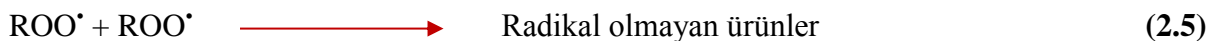
Elektron Transfer Reaksiyonu



Sonlanma Reaksiyonu



Disproporsiyonlaşma



Peroksil radikalinin standart redüksiyon potansiyeli 1000 mV olup, ROS türleri içerisinde yüksek redüksiyon potansiyeline sahip radikallerdendir [11]. Bu nedenle, hücre zarları gibi uzak hücresel yerlere dağılmasını sağlayarak insan sağlığına ve gıda bileşiklerine zarar

vermektedir. Buna ek olarak peroksil radikali ortamda var olan tüm antioksidan tükendikten sonra hedef molekülle reaksiyona girmektedir [12].

Peroksil radikalının hedef molekül (RH) veya antioksidan (AH) ile reaksiyonu;



Hem hidrofobik hem de hidrofilik ortamlarda, peroksil radikali, karbon-merkez radikalın oksijen ile reaksiyonunun otoksidasyon olarak adlandırılan bir sonucu olarak oluşmaktadır. Peroksil radikali önemli bir ROS, çünkü oluşumu lipid peroksidasyonunda önemli bir zincir yayılım adımıdır [13].

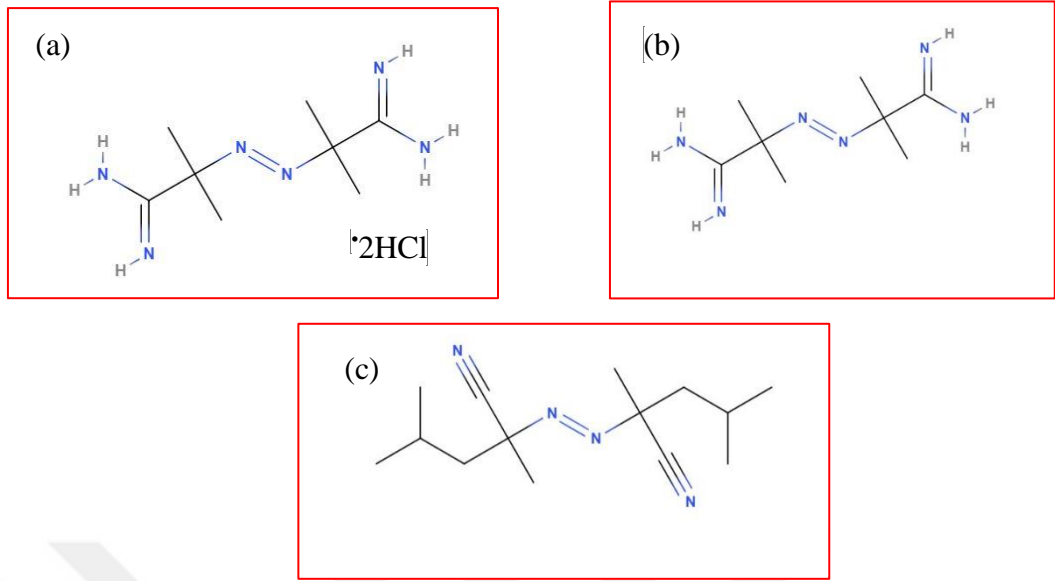
2.2.2 Peroksil Radikal Oluşumu

Genel olarak peroksil radikali alkil radikalının (R^{\bullet}) oksijenle reaksiyona girerek oluşmaktadır.



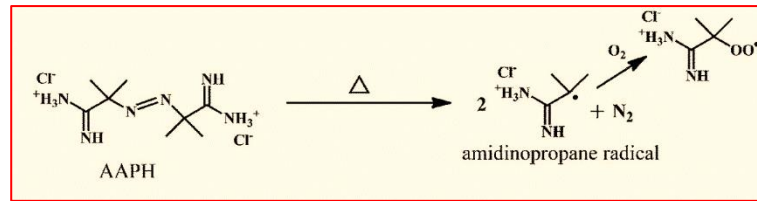
Bu reaksiyon oldukça hızlıdır, 10 μs 'den daha kısa süre içerisinde gerçekleşmektedir ve hız sabiti yaklaşık 109 $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ 'dir.

Suda çözünen 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorür (AAPH) ve 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür (ABAP) gibi Termolabil azo bileşikleri ve yağda çözünen 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) suda çözünen peroksil radikalleri oluşturmak için serbest radikal başlatıcıları olarak etkili bir şekilde kullanılmıştır [14,15].



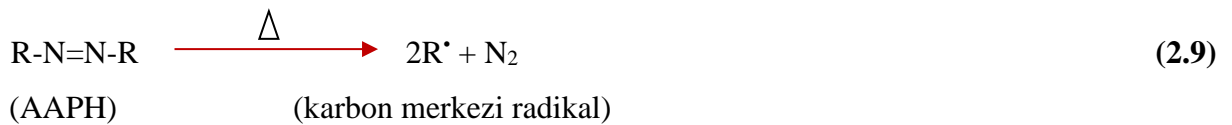
Şekil 2.4: AAPH'in (a), ABAP'in (b) ve AMVN'in (c) kimyasal yapısı

2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorür (AAPH)'nın termal bozulması en çok kullanılan peroksil radikali oluşturma yöntemleri arasında gelmektedir [16]. AAPH suda çözünen, serbest radikal üreten azo bileşiktir. Hem nükleofilik hem de serbest radikal mekanizmaları ile oksidasyon reaksiyonlarını başlatabilme özelliğinden dolayı küçük moleküller ve protein terapötikleri için oksidan modeli olarak önem kazanmaktadır [17]. AAPH'in termal bozunması sonucu oluşan peroksil radikali aşağıda gibidir [18].



Şekil 2.5: AAPH'in termal bozunması sonucu oluşan peroksil radikali

Peroksil radikali üretmenin bir başka yolu ise yağda çözünebilen 2,2'-azobis (2,4 dimetilvaleronitril) (AMVN)'in termal bozulmasıdır [16]. AAPH ve AMVN gibi azo bileşiklerinin peroksil radikali oluşturma reaksiyonları 2.9 ve 2.10'da aşağıda verilmektedir.





2.3 LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu, karbon-karbon çift bağları olan lipidler içeren hücre bileşenleri, özellikle de membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ciddi hasara neden olan oksidatif bir süreçtir. Lipidlerdeki çift bağlar, yüksek aktivitenin içsel bölgelerini sunar [2]. Lipid oksidasyonu çok ciddi bir yıkıcı süreçtir, çünkü bu hasar, daha reaktif yağlı aldehit türlerinin daha fazla salınmasıyla daha da güçlendirmektedir. Lipid peroksidasyona sebebi olan zincir reaksiyonu aşağıda verilmektedir.

Başlama



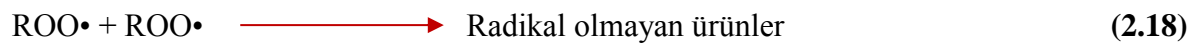
Çoğalma



Kısıtlama



Sonlanma



(R-N=N-R = azo bileşiği; LH = substrat; AH = antioksidan; ROO[•] = peroksil radikali; LOO[•] = lipid peroksil radikali; ROOH = hidroperoksit [19])

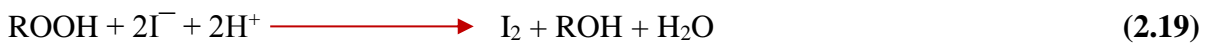
Lipid peroksidasyonunun membranda veya serbest yağ asitlerinde başlaması hidrojen atomu çıkarabilecek reaktiviteye sahip herhangi bir türün saldırısından kaynaklanır. Hidrojen atomu yalnız bir elektrona sahiptir ve arkasında eşleşmemiş elektronlu karbon atomu bırakır. Çoklu doymamış yağ asitlerindeki karbon radikali, yeni moleküler düzenleme ile kararlı olma eğilimindedir. Hidroperoksi radikalleri diğer yağ moleküllerinden hidrojen atomu çıkarırlar ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde devam eder [19,20].

PUFA'lar, hidrojenin tıkanması veya bir elektronun süperoksit veya hidroksil radikalleri tarafından çift bağdan ekstraksiyonu yoluyla çok aşamalı oksidasyonda saldırıya uğrar; bu da asidik lipid peroksil radikalleri (LOO[•]) oluşturmak için moleküler oksijenle doğrudan reaksiyona giren radikal bir ara maddeye yol açar. LOO[•] kendiliğinden bölünme veya modifikasyona girerek sırasıyla aldehitler ve yoğunlaşma ürünleri oluşturmaktadır [2]. Sonraki zincir reaksiyonlarında hidrojenin tıkanması yoluyla lipid hidroperoksitler (LOOH'ler) birincil ve toksik ürünler olarak oluşur.

Doğal olarak, lipidlerin yapısı özellikle de hücre zarı fosfolipidleri yok edilir. Bu nedenle, hücrelerdeki peroksil radikal seviyelerini tespit etmek ve ölçmek için teknikleri dizayn etmek çok önemlidir. Analitik Kimyada, lipid hidroperoksitlerin (LOOH'ler) belirlenmesi, vücuttaki oksidatif stres seviyesini tahmin etmek için çok yararlı ve en kullanışlı bir kriterdir. Lipid peroksidasyonu belirlemesi için literatürde sık sık kullanılan metotlar.

2.3.1 İyodometrik Yöntemi

Hidroperoksit tayini için spektroskopik yöntem olan ve karmaşık biyolojik sistemlere uygulanabilen iyodometrik yöntem geliştirilmiştir [21]. Bu tahlilde, hidroperoksitler, iyodür ile indirgeme reaksiyonuna girip iyot oluşturmaktadır. İndirgeme reaksiyonu ise hem kantitatif hem de stokiyometriktir. Hidroperoksitler ve iyodür reaksiyona girdiğinde iyodür her zaman fazla miktarda olmalıdır. Fazla miktarda verilen iyodür, iyotla reaksiyona girerek triiyodür (I₃⁻) kromofor oluşturmaktadır reaksiyon denklemleri aşağıda verilmiştir.



Bu kromofor, titrimetrik iyot oksidasyonuna dayanan hidroperoksitlerin doğrudan belirlenmesi için kullanılarak hidroperoksitlerin nicelleştirilmesi için bir temeldir. Bu tahlilin, arasında 1:1 stokiometrik reaksiyon olsa bile güvenilir ve hassas olmadığı söylenir [22]. Oluşturan triiyodür, tiyosülfat titrasyonu, spektrofotometri veya florometri yöntemleri gibi titrimetrik iyot oksidasyonuna dayanan yöntemlere kullanar niceleştirilmektedir. Hidroperoksitlerin doğrudan belirlenmesi için titrimetrik iyot oksidasyonu kullanılmaktadır.

2.3.2 TBARS Yöntemi

Biyolojik sistemler için bir alternatif olarak, Tiyobarbitürik asit (TBA) metodu geliştirilmiştir [23]. Ancak aynı zamanda lipid peroksidasyonunu miktarını daha az vermek gibi zorluklara da sahiptir. Bununla birlikte bu metot, çok sayıda biyokimyasaldan kaynaklanan müdahaleler nedeniyle şüpheli geçerliliğe sahiptir, ayrıca hidroperoksit içeriğini ölçmez [22]. Araştırmalarda mevcut olan basit TBA metodunun reddedilmesi önerisi bulunmaktadır, çünkü insan vücudu sıvılarındaki çoğu TBA-reaktif maddenin, lipid peroksidasyonu ile hiçbir ilişkisi yoktur [24]. Analizden önce malondialdehit (MDA)-TBA kromojenini izole amacıyla HPLC kullanılarak TBA yönteminde bir gelişme yapılmıştır [23].

2.3.3 FOX ve FTC Yöntemi

İyodometrik Yöntemi ile aynı prensibi kullanan Demir oksidasyonu/ksilen oranj (FOX) yöntemi, asidik koşullarda hidroperoksit ile Fe^{2+} 'nin (demir (II) -demir (III) oksidasyonu) hızlı oksidasyonuna dayanarak geliştirilmiştir. Fe^{3+} iyonları, ksilen oranj ile reaksiyona girerek 560 nm'de güçlü absorpsiyona sahip olan mor renkli bir kromofor oluşturmaktadır [22]. Ayrıca demir (II) – demir (III) oksidasyon prensibini kullanan temel olarak linoleik asit emülsiyon sistemlerinde lipid hidroperoksitleri değerlendirmek için Ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu öne sürülmüştür [25]. FOX'tan tek fark, elde edilen ferrik iyonların tiyosiyanat iyonları (SCN^-) kullanılarak ölçülmesidir. Tiyosiyanat iyonları (SCN^-) kırmızı renkli kromofordur yaklaşık 500 nm'de absorpsiyona sahiptir. Ancak, bu metodun çok sınırlı bir çalışma pH aralığında (1.7-1.8 arasında) olması [26] ve askorbik asit ile glutatyon [27] gibi antioksidanlardan etkilenmesi dezavantajları vardır.

2.4 NANOPARTİKÜLLER

Son on yılda, nanoteknoloji, bilim ve teknolojik uygulamalarının pek çok alanını kapsayan oldukça umut ve heyecan verici, yenilikçi ve çeşitli bilimsel alanlarda ilginç bir araştırma konusu olmuştur. Şu anda benzersiz yüzey alanı ve yüzey aktivitesi nedeniyle hızla gelişen nanoteknoloji, alanının ön saflarındadır [7, 28 - 31].

Nanopartiküller (NP'ler), farklı kimyasal bileşime, şekle ve en önemlisi 1–1000 nm arasında boyutlara sahip katılardır [32]. NP'ler, bulk ve moleküler materyal arasındaki maddenin ara bir supramoleküler halini temsil etmektedir. Ayrıca, olağanüstü boyutlarına bağlı fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle diğer malzemelerden daha üstündürler ve bilimde vazgeçilmezdirler [28,32]. Nanopartiküller ayrıca ultra küçük boyutlarından dolayı benzersiz optik ve elektriksel özelliklere, uzun vadeli stabiliteye ve düşük toksisiteye sahiptir [33]. Buna ek olarak, yapısal değişimleri ve eşsiz biyolojik, termal ve elektriksel özellikleri, onları pestisitlerin algılanması ve yok edilmesinde, [7], biyoloji ve tıp / nano-tıp [30,31], görüntüleme ve algılama [28,29] ve diğer birçok ticari sanayi, gıda, tarım, giyim ve kozmetik alanlarında [34] çeşitli uygulamalar için uygun hale getirmektedir.

NP'ler pek çok bilimsel alanda sıkça kullanıldığından dolayı, nanopartikül sentezlenmesinin de önemini arttırmaktadır. Bilimsel yöntemler ile üretilebilen NP'ler doğal yollarla da oluşabilmektedir. Nanopartiküller büyüklüklerine, morfolojilerine, fiziksel özelliklerine ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Yarı-iletken nanopartiküller (kuantum noktaları), metal NP'ler, silika NP'ler, polimer NP'ler ve metal nanokümelere ve çoğu floresan özelliklere sahiptir [35,36].

2.4.1 Altın nanoparcacıklar

Altın nanoparcacığının çok yönlülüğü ve potansiyeli vardır. Altın nanopartiküller (AuNP), eşsiz özelliklerine ve çoklu yüzey işlevlerine sahip olmasından dolayı görüntüleme ve algılama gibi farklı bilimsel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. AuNP, optik özellikler, elektronik özellikler, geniş yüzey-hacim oranı, mükemmel biyoyoumluluk ve düşük toksisite boyutuna ve şekline bağlı olan olağanüstü özelliklere sahiptir [8]. AuNP, çekirdek boyutu 1'den 100 nm'ye yükseldikçe sulu çözelti içinde bir dizi renk (kahverengi, turuncu, kırmızı ve mor) sergilemektedir ve genellikle 500'den 550 nm'ye kadar bir boyutları göre absorpsiyon

sergilemektedir. AuNP biyo-inert, en kararlı metal nanopartiküller, sentezlenmesi kolay, diğer malzemelerle kolayca işlevselleştirilebilir ve yüksek yok olma katsayısı gibi özelliklere sahiptir. Yüksek yok olma katsayısına sahip olmasından organik floresan molekülleri yakınlarına yerleştirildiğinde floresan söndürmeye neden olurlar. Ligandlar için yüksek afiniteye sahiptirler. Bu da kaplama ligandların fonksiyonel grubunun reaktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca, radikal süpürme reaksiyonları için yüksek katalitik aktivitelere sahiptirler [8].

Son birkaç on yılda, boyut, şekil ve yüzey işlevselliği göz önüne alınarak altın nanopartikülleri sentezlemek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Turkevich ve arkadaşları (1951), sitratın hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak kullanarak işlev gördüğü kaynar suda sitrik asit ile hidrojen tetrakloroauratın (HAuCl_4) işlenmesiyle AuNP oluşturmak için sentetik bir yöntem geliştirilmiştir [37]. Bu sitrat stabilize edilmiş AuNP, tiyolat ligandları ile işlevselleştirme işlemi sırasında geri dönüşümsüz agregasyona maruz kalmaktadır. Yüzey aktif madde kullanımı da dahil olmak üzere bu sorunu çözmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Brust ve Schiffrin, 1994 yılında altın nanopartikül sentezinde, faz transfer Reaktif olarak tetraoktilamonyum bromür (TOAB) ve indirgeyici ajan olarak sodyum borohidrit (NaBH_4) kullanılarak iki fazlı bir indirgeme protokolü ile organik çözünen alkantiyol stabilize edilmiş AuNP oluşturarak bir atılım gerçekleştirdi [38]. Bu metodoloji, altın-tiyol oranı, indirgeme oranı ve reaksiyon sıcaklığı gibi reaksiyon koşullarını değiştirerek 1.5 ila 5 nm arasında AuNP oluşturmaktadır.

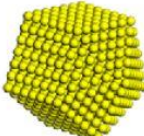



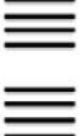
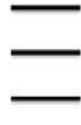
2.5 NANOKÜMELER

Metal nanokümelere, esas olarak molekül benzeri özelliklerinden dolayı floresan problemleri tasarlamak gibi çeşitli bilimsel çalışmalarda oldukça heyecan verici ve moda uygun bir konu olarak olağanüstü dikkat gösterilmektedir [39]. Bu izole parçacıklar, tek metal atomları ve plazmonik metal nanopartiküller arasındaki eksik bağlantı olarak hayati bir rol oynamaktadır, çünkü elektronların Fermi dalga boyuna benzer 2 nm'den daha küçük boyutlara sahiptir ve birkaç ila yüz atomdan oluşmaktadır [40 - 42].

Geçiş metal nanokümelere nanometre ile ölçülen boyutlarından dolayı özgün ve ilginç, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı da çok ilginç potansiyel kullanım alanlarına sahiptir. Bunlar arasında kuantum noktaları ve kuantum bilgisayarları, optik, elektronik ve manyetik cihazlar,

kimyasal sensörler, düz panel ekranlar gibi fotokimyasal desen uygulamaları sayılabilir. Fakat geçiş metal kümelerindeki hızlı gelişmenin asıl nedeni onların katalitik özelliğidir. Geçiş metal nanoküpleri birçok tepkime için yüksek etkinliğe ve seçiciliğe sahip yeni tür özel katalizörlerdir. Katalitik etkinlik, bir yandan kümelerin yeterince kararlı olmasını gerektirirken, bir yandan da etkin merkezlerin bulunduğu geniş yüzey alanı gerektirir. Yüzeydeki atomların içtekilere oranı ise boyutun küçülmesi ile artar. 2 nm'den daha küçük boyutlara sahip olan nanoküplerin, parçacıklardaki serbest elektronların güçlü kuantum sınırlaması nedeniyle ayırık ve boyut ayarlı elektronik geçişler gösterdiği düşünülmektedir[43], [44]. Ayrıca, maddenin kesintisiz yoğunluğu farklı enerji seviyelerine ayrılmaktadır [45,46]. Bundan dolayı, nanoküpler farklı enerji seviyeleri, güçlü ve boyut/morfolojiye bağlı floresan da dahil olmak üzere molekül benzeri özelliklere sahiptir [42]. Tek atom, kümeler ve nanopartiküllerin geometrik ve elektronik yapılarını karşılaştırılması Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 2.2: Tek atom, kümeler ve nanopartiküllerin geometrik ve elektronik yapılarını karşılaştırılması.

	Nanopartiküller	Nanoküpler	Tek atom
Geometrik yapısı	 5 nm	 1 nm	 0.1 nm
Elektronik yapısı	 Metal enerji bantları	 Moleküler orbital	 Atomik orbital

NC'lerdeki metal atomların elektronları, özel ayırık enerji seviyeleriyle moleküller boyutlarında sınırlıdır. Dolayısıyla sağlam fotoluminesans, olağanüstü fotostabilitesi ve asıl biyouyumluluk gibi önemli ölçüde benzersiz optik, kimyasal ve elektriksel özelliklere sahiptir [45]. NC'ler metal atom elektronları moleküler boyutlarda ve özel kesikli enerji seviyelerinde kısıtlanmaktadır [36,45,47]. NC'ler bu mükemmel yeni özelliklere sahip olduğundan dolayı biyolojik analiz ve görüntüleme, çevresel izleme ve endüstriyel kataliz gibi çeşitli alanda mükemmel floresan problemler olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, NC'lerin özelliklerini ve

uygulamalarını sentezlemek ve incelemek için önemli adımlar atılması şaşırtıcı değildir [47,48]. Özellikle biyolojik, çevresel, farmasötik ve kataliz alanlarında altın nanokümerlerin sentezi ve uygulanmasında yoğun araştırmalar yapılmaktadır [39].

2.5.1 Altın Nanokümerleri

Basit, hızlı ve kolay kontrol edilebilir adımlarla yüksek kalitede altın nanokümerler (AuNC) sentezi öncelikle hedeflenmektedir. NC'lerin sentezi için birçok yeni yöntem, şablon destekli sentez ve kaplama ajanları yaklaşımlarının kullanımına dayalı olarak tasarlanmıştır [44]. Şablon destekli sentez, proteinler ve DNA, dendrimerler (poli(amidoamin)) ve polimerler (poli(metakrilik asit)) gibi biyomoleküllerin floresan NC'lerin oluşumunu yönlendirmek için bir model olarak kullanılmasına dayanmaktayken [33,44] kaplama ajanları, tiyol ligandları gibi kaplama ajanlarının kullanımına dayanmaktadır. Kaplama ajanları oluşan küçücük metal NC'leri kaplayan ve koruyan tek tabakalı bir metal yüzey oluşturmak için kendilerini metal yüzeye sıkıca tutturmaktadır. Şablon destekli sentezlenmiş NC'ler, minyatür moleküller/biyomoleküller için problemler olarak kullanımlarını sınırlayan nispeten büyük bir hidrodinamik çapa (>3 nm) sahiptir.

Altın nanokümerlerin kalitesi ligand, indirgeyici ajan ve uzun yaşlanma süresi olmak üzere üç faktörden etkilenmektedir [47]. Nanokümerlerin sentezi için bir yöntem geliştirirken bu faktörlere dikkat edilmesi gerekmektedir. Ligandlar birden fazla gruptan oluşmaktadır. Bu gruplar, NC'lerin toplanmasını önlemek için altın iyon (Au^{3+}) kümelerin geometrisi ile güçlü etkileşim sağlamaktadır [47]. NC'ler genellikle oluşumları sırasında agregate olabilmektedir. Bu nedenle yaygın olarak, sulu çözeltide metal iyonlarının indirgemesinden sonra NC'ler yerine büyük nanopartiküller oluşmaktadır [33]. NC'leri stabilize etmek için çeşitli ligandlar (kaplama ajanları) / stabilizatörler kullanılmaktadır. Ne yazık ki, parçacıkların yüzeyini kapatmak için kullanılan ligandlar, parçacıkların emisyon özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir [49]. Sonuç olarak, çok küçük boyut ve yüksek oranda floresans özelliklere sahip olan metal NC'ler elde etmek için, kümelerin toplanmasını önlemek ve floresanslarını arttırmak için stabilizatörler büyük önem taşımaktadır.

Dendrimerler, DNA oligonükleotitleri, peptitler ve proteinler [50,51], GSH gibi tiyoller [33] ve polimerler gibi stabilizatörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tiyol bileşenlerle kaplanmış metal NC'ler, istenilen özelliklerinden dolayı yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu özellikler

olağanüstü kararlılık, ultra küçük hidrodinamik çaplar ve değiştirilebilir yüzey özellikleridir [33,44].

Çevre dostu olan GSH, mükemmel kararlılığı (iki haftadan fazla) ve biyouyumluluğu nedeniyle AuNC'in sentezinde kullanılan en iyi indirgeyici ajanlardandır [10]. GSH-AuNC', Cr (III) ve Cr (VI) gibi ağır metallerin belirlenmesinde [52] ve kümelerin silika parçacıkları ile modifiye edilerek reaktif oksijen türlerinin canlı hücrede görüntülenmesi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır [53]. Bununla birlikte GSH-AuNC'in (tek ligand olarak GSH) sentezi, GSH'nin fazlalığını giderme ihtiyacı ve düşük kuantum verimi (% 1.5) gibi dezavantajlarından ötürü pek tercih edilmemektedir [52]. AuNC'ler ayrıca H₂AuCl₄ L-histidin ile karıştırarak ısıtmadan, karıştırmadan ve baskı yapmadan hızlı bir reaksiyonla sentezlenmiştir [54]. Histidin çok önemli bir biyolojik substrat olmasına rağmen [55], histidinle stabilize edilen AuNC'in kalitesinden, florimetri ve kütle spektrometrisinden elde edilen verilere göre şüphe edilmiştir [39].

GSH'nin H₂AuCl₄ ve L-histidin karıştırılarak sentezlenen AuNC'in floresans intensitesini önemli ölçüde, doğrusal ve seçici olarak arttırdığı ve kuantum veriminin de %10'un üzerinde arttığı bildirilmiştir [10]. Bu, GSH ve histidin arasındaki AuNC yüzeyinde meydana gelen ligand değişimine atfedilmiştir. GSH, nanopartikülün yüzeyine daha zayıf Au-N bağları ile tutturulmuş histidin moleküllerinin yerine, güçlü Au-S bağları geçerek AuNC'in floresans intensitesinin amplifikasyonuna yol açmaktadır [49]. GSH Au-S bağları yoluyla bağlanmaktadır. AuNC'in sentezi sırasında GSH ve histidin oranının dengeli olması gereklidir. Çünkü yüksek GSH konsantrasyonlarında AuNC yüzeyleri neredeyse GSH ile kaplanmış. Bu nedenle çözeltiye GSH ilavesi, düşük GSH konsantrasyonunda olduğu gibi AuNC yüzeyindeki orijinal histidin ligandlarının yerini almamaktadır [10].

Bu stratejiyi kullanarak sentezlenen AuNC'in antiviral özelliklerini incelemek [56] gibi çeşitli uygulamalar bulunmaktadır [10]. Bu AuNC, 402 nm'ye yakın bir tepe noktası ve 230 ile 650 nm arasında bir emilim spektrumuna sahiptir, ancak 550 nm'den sonra emilim ihmal edilmektedir [56,57]. 502 nm'de güçlü floresans emisyonu ve ayrık uyarma emisyon bantları sergilemektedir. Bunun nedeni güçlü bir yeşil floresans ile bu zirvede bantlar arası geçişlerinden kaynaklanmaktadır [56,58]. Bu prosedüre göre sentezlenen AuNC'in kuantum verimi % 6.8'dir ve 5.20 ± 0.05 ns floresans ömürleri vardır [56,58]. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsüne göre ortalama çapları 1.5 ± 0.5 nm'dir ve dinamik ışık saçılımına göre hidrodinamik çap dağılımı 2.5 ± 0.7 nm'dir [56]. Histidin ve GSH'nin AuNC

yüzeylerine başarılı bir şekilde bağlanması, Fourier transform infrared ve X-ışını fotoelektron spektrometresinden elde edilen verilere göre C-NH ve Au-S'nin varlığına dayanarak kanıtlanmıştır, ayrıca AuNC ana fonksiyonel gruplarının, COOH ve NH₂ olduğu ileri sürülmüştür [56].

2.5 PEROKSİL RADİKAL DEDEKSİYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER

ROO'nun biyokimya, gıda ve çevre bilimindeki önemi nedeniyle, peroksil radikali süpürme aktivitesini değerlendirmek için hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonlarına dayanan tekniklerinin geliştirilmesine çok çaba gösterilmektedir [59]. Seçici ve yüksek hassasiyete sahip problemlerin geliştirilmesinde birçok zorluk olmasına rağmen, lipid hidroperoksitlerini doğrudan ölçmek amacıyla farklı florimetrik, elektrokimyasal, kemilüminesans ve akış enjeksiyon esaslı analiz yöntemleri geliştirilmiştir [9,60]. Floresansa dayalı çeşitli yöntemler geliştirip veri toplamadaki üstün duyarlılığı, seçiciliği ve sadeliği nedeniyle geniş bir alanda uygulanmaktadır [61]. Floresans yöntemlerinde, basit ve kullanımı kolay olan enstrümanlar gerekmektedir, üstelik bu yöntemde analiz altındaki numuneye zarar verilmemektedir.

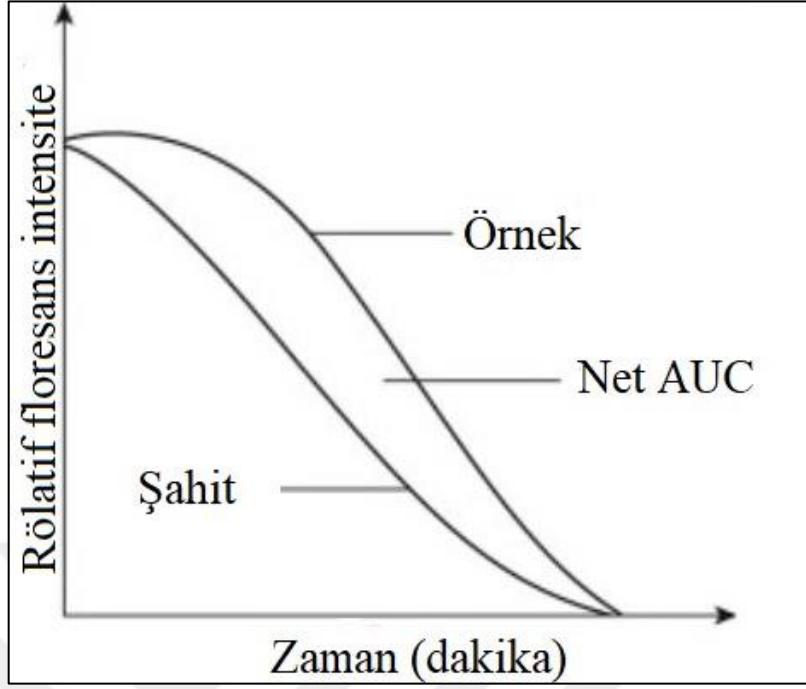
2.5.1 ORAC Yöntemi

Probun floresans intensitenin sürekli olarak üretilen bir ROO' akışı altında zamanla nasıl azaldığını gözlemlemeye dayanan oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemidir. Bu yöntem peroksil radikal süpürme kapasitesini ve peroksil radikale karşı antioksidan aktiviteyi incelemek için yaygın olarak uygulanmıştır [15]. Konvansiyonel ORAC yönteminde, sonuçlar floresans azalma eğrisi altındaki alana göre değerlendirilmektedir. *β-phycoerythrin*[3], [62] ve *R-phycoerythrin* [62] gibi floresans proteinler bu tür yöntemlerde kullanılmıştır. Bunlar floresans olmayan ürünler oluşturarak ROO' ile reaksiyona girmektedir. Başlangıçta, *β-phycoerythrin* (*β-PE*), tek hücreli kırmızı algler *Porphyridium Cruentum*'un bir laboratuvar kültüründen sentezlenmiştir [62]. Ama bu yöntemde ayırma ve saflaştırma gibi zahmetli süreçlerin yapılması gerekmektedir. Bu yöntemde, floresansın, zincir kıran antioksidanların varlığında inhibe edilmesi [63]; probun, güneş ışığına dayanıklı olmaması, büyük "lot-to-lot" değişkenliği ve polifenoller ile spesifik olmayan bağlanma sergilemesi gibi dezavantajlar söz konusudur [19].

Protein olmayan bir prob olan floresein, bu sorunların üstesinden gelmek için β -PE'nin yerine kullanılmaktadır [64]. Bu deneyde, floresein'in B-phycoerythrin'e göre daha üstün olduğu ve diğer yaygın yöntemlerden farklı olarak, geliştirilmiş ORAC-FL deneyinin peroksil radikale karşı hidrofilik zincir kırma antioksidan kapasitesinin doğrudan bir ölçüsünü sağladığı öne sürülmektedir. Ancak floreseinin, floresans olmayan ürünler oluşturmak için istenmeyen yan reaksiyonlara maruz kaldığı ileri sürülmektedir [61]. Buna ek olarak, etkileşimler ve floresans söndürme işlemine tabi tutulmaktadır [65].

Klasik ORAC deneyleri, sadece hidrofilik zincir kırılmasına maruz kalan antioksidanlarla sınırlıdır. Ayrıca, karmaşık örnekler için ORAC değerlerinin yorumlanması oldukça sorunludur, çünkü ORAC indeksi, prob reaktivitesine bağlı olan peroksil radikale karşı antioksidanların reaktivitesine göre belirlenmektedir [66]. Suda çözünürlüğü arttıran bir oligosakarit olan metile β -siklodekstrin içeren aseton ve su karışımı hem hidrofilik hem de lipofilik zincir kırma antioksidanları incelemek için kullanılabilir. Ne yazık ki, nispeten kararlı komplekslere bağlı parazitler, antioksidanların oksidasyonunu önleyen yüksek konsantrasyonlarda oligosakkaritlerde gözlemlenebilmektedir [67].

Genel olarak oluşturulan radikaller ile fikoeritrin arasındaki yükseltgenme reaksiyonu sonucunda, fikoeritrinin floresansındaki zamana bağlı düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan (area under curve – Net AUC) tekniğini kullanan **(Şekil 2.6)** [68] bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de inhibe etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir[5]. Antioksidan varlığında ve yokluğunda eğri altında kalan alanlar farkından bulunan net AUC, antioksidan miktarıyla orantılıdır.



Şekil 2.6: Analiz örneğinin eğri altında kalan alan (AUC).

2.5.2 TRAP Yöntemi

Toplam peroksil radikal yakalama potansiyeli (TRAP), bir antioksidanın ROO• radikalini süpürme kabiliyetini ifade etmektedir ve buna dayanarak toplam radikal yakalama antioksidan parametre (TRAP) yöntemini geliştirmiştir [69]. Bu, bir lipid peroksidasyon reaksiyonu sırasında oksijen alımını izlemeye dayanmaktadır. Hedef maddenin oksidasyonu oksijen tüketimine yol açmaktadır. Ancak antioksidanların varlığında maddenin oksidasyonunu inhibe etmektedir. Kontrollü bir ROO• peroksidasyon reaksiyonundaki ölçümler, plazma gibi antioksidan maddeler tarafından inhibe edilen oksijen alımının zamanının gecikmesine dayanmaktadır [70,77]. Bu yöntem özellikle serum ve plazma gibi in vitro antioksidanların antioksidan gücünü incelemek ve karşılaştırmak için uygulanmaktadır [72,73]. Yöntem, serumun kimyasal olarak oluşturulan ROO• tarafından peroksidasyona direnebileceği zamana dayanmaktadır [73].

Bu yöntem çeşitli yaklaşımlarla gerçekleştirilmiştir [72]. Biyolojik ortamda çeşitli ROS ve RNS'leri tespit etmek için yaygın olarak kullanılan TRAP deneyinin en yaygın yaklaşımlarından biri, bir floresans probu olarak 2,7- diklorodihidrofloresin diasetatın (DCFH-DA) kullanılmasıdır. Serumdaki esterazlar, 2,7-diklorodihidrofloresin (DCFH) oluşturmak

için DCFH-DA'yı hidrolize eder. DCFH daha sonra termal olarak üretilen AAPH ile oksitlenerek bir floresan özelliklere ($\lambda_{ex} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 522 \text{ nm}$) sahip olan 2,7-diklorofloresein (DCF) oluşumuna yol açmaktadır [73]. DCFH, lipitlerde çözünür ve hem lipofilik hem de sulu fazda radikallerle reaksiyona girer. Bu, diklorofloreseinin oksidasyonunu inhibe eden hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanları değerlendirmek için uygulanmaktadır [14]. Bununla birlikte, DCF'nin diğer ROS'lar tarafından oksitlenebileceğinden dolayı DCFH-DA kullanımını eleştirilmektedir, bu nedenle yöntemin seçiciliği düşüktür [74].

Başka bir TRAP deneyinde, prob olarak floresans R-phycoerythrin (PE), bir litre solüsyon tarafından etkisizleştirilen peroksil radikalın mikromollerinde sonuç vermek için kullanılmaktadır. Antioksidanların varlığında, PE'nin oksidasyonu engellenir ve bu nedenle floresans intensitesinde azalma dayalı ölçümler yapılmaktadır [75]. DCFH-yönteminin bir kısıtlaması, sulu ortamında DFCH radikallerle reaksiyonu antioksidanlar tarafından inhibe edilmesidir. Ayrıca, tüm antioksidanlar için tanımlanmış bir gecikme fazı gözlenmez ve bu aşamadan sonra antioksidan kapasitesinin profili dikkate alınmamaktadır. Bu yöntemde elde edilen sonuçlar tekrarlanamaz, çünkü farklı laboratuvarlarda uç noktayı belirlemek için farklı kriterler kullanılır. Ayrıca, DCFH-DA yönteminde ve genel ORAC yönteminde tarif edilen floresans problemlerinin, oksidatif olarak floresans azalmasının ve antioksidan etkisinin, biyolojik maddeleri yakından taklit etmediği söz konusudur [12].

2.5.3 PABA Yöntemi

Peroksil radikal süpürücü aktivitesi de p-aminobenzoik asidin (PABA) floresan artışı ile incelenmiştir [5]. PABA probunun, floresans olmayan ürünler oluşturarak peroksil radikalinden kaynaklanan oksidasyona bağlı olan floresans intensitesinin azaldığı ve antioksidan özelliklere sahip olan maddelerin varlığında bunun tersi bir durum olduğu bildirilmiştir. Oysa singlet oksijen varlığında fotodegradasyon indirgenme reaksiyonuna giren PABA'nın stabilitesini etkileyebilmektedir [76]. Klasik ORAC yöntemi, toplam radikal yakalama antioksidan parametre (TRAP) hesaplamalarında protein tiyollerinden bir sınırlama yaşamaktadır. Buna ek olarak, tiyollerin ORAC değerleri için çeşitli araştırmacılar tarafından glutatyon için çok farklı değerler ve sistein için sıfır değer gibi tutarsız sonuçlar bildirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak tiyol-tipi ve plazma antioksidanlarının, amino asitlerin peroksil radikal süpürme aktiviteleri

belirlenmesinde bu zorlukları üstesinden gelmişti. Ayrıca, doku homojenizatlarına (karaciğer, böbrek ve kalp) uygulanmıştır. Alınan değerler referans yöntem olarak seçilen ORAC yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Güçlü ve arkadaşların (2014) tarafından geliştirilen bu yöntemde tiyol tipi antioksidanların amino asitlere göre daha yüksek aktivitesine sahip olduğu öne sunmuştu [5].

2.5.4 Krosin Ağartma (Beyazlatma) Yöntemi

Peroksil radikal süpürmesini incelemek için antioksidanların peroksil radikalinden kaynaklanan krosinin oksidasyonunu önlemesine dayanan Krosin Ağartma Yöntemi, başka bir başarılı yöntemdir [77]. Plazma antioksidanlarının antioksidan kapasitelerini ölçmek için ilk olarak Bors ve diğ. [77] tarafından önerilen yöntemde, azo başlatıcının sıcaklıkla bozunması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından bir karotenoid olan krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir. Çözelti içinde turuncu bir renge sahip olan ve 440nm'de bir absorpsiyona sahip olan krosin, safrandan izole edilmiş bir karotenoiddir. Yöntem, AAPH'ın sıcaklıkla bozunması ile oluşan peroksil radikallerinin, krosini oksidasyona uğratmasına (ağartmasına) dayanmaktadır [77]. Karışıma eklenen maddedeki antioksidanlar bu ağartmayı önlemektedir. Krosin ağartma deneyinde, krosin fosfat tamponu içinde hazırlanmakta ve ROO^{*}, AAPH'ın termal ayrışmasıyla üretilmektedir. Reaksiyon AAPH eklenmesi ile başlatılır ve krosin beyazlaması 440 nm dalga boyunda spektrofotometre ile izlenmektedir. 440nm'de antioksidan varlığında ve yokluğunda absorbansdaki azalma, belirli bir süre sonra ölçülüp yüzde inhibisyon hesaplanmaktadır [77].

Bu yöntem, fenolik bileşiklerin, flavanonların, plazmanın antioksidan kapasitesini incelemek için başarıyla uygulanmıştır [12]. Çoğu fitokimyasalınkine benzer reaksiyon hızlarına sahip olduğundan dolayı bu yöntemde gecikme fazı sorunları ile karşılaşılmamaktadır. Bununla birlikte, krosin bir gıda pigmenti olduğundan, bu yöntemin gıda örneklerine uygulanması çok sınırlıdır. Krosin, karotenoidler gibi gıda numunesinin analizi ve deneyleri arasında düşük tekrarlanabilirlik sergilemektedir; bunun nedeni onların absorpsiyonunun, krosin'le aynı dalga boyunda gerçekleşmesidir [12].

Krosin Ağartma Yöntemi, antioksidanların diğerlerine karşı rekabet etme yeteneğini değerlendirmektedir. Ayrıca, kullanılan krosin konsantrasyonu sabit tutulur, ancak farklı

konsantrasyon bileşikleri kullanıldığı için farklı krosin konsantrasyonları gereklidir. Bu yöntemin kinetik çalışmasından, farklı antioksidanların antioksidan kapasiteleri troloks eş değerine yakın olması kanıtlanmıştır [77]. Ne yazık ki, bu yöntemi kullanarak Troloks eş değeri olarak ifade edilen askorbik asidin antioksidan kapasitesi, diğer yöntemlerden elde edilenden daha yüksektir [6].

2.5.5 Nanosensor Esaslı Peroksil Radikal Süpürme Aktivite Yöntemi

Çelik ve diğerleri tarafından hidroperoksidlerin iyodürü yüksetgeme yeteneğinden yararlanarak hem hidroperoksidlerin tayini hem de antioksidan karakterli bileşiklerin peroksil radikali süpürme etkinliğini ölçmek için nişasta stabilize AuNP kolorimetrik nano-sensör geliştirilmiştir [9]. Bu yöntemde, hidroperoksitler, iyodür ile indirgeme reaksiyonuna girip iyot oluşturmaktadır. İndirgeme reaksiyonu ise hem kantitatif hem de stokiyometriktir. Hidroperoksitler ve iyodür reaksiyona girdiğinde iyodür her zaman fazla miktarda olmalıdır. Fazla miktarda verilen iyodür, iyotla reaksiyona girerek triiyodür (I_3^-) kromofor oluşturmaktadır. Bu kromofor, titrimetrik iyot oksidasyonuna dayanarak nişasta stabilize AuNP kolorimetrik nano-sensör kullanılıp oluşturan triiyodür niceleştirerek hidroperoksitlerin doğrudan belirlendi. Bu yöntemde çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikali süpürme aktiviteleri literatürde mevcut olan ORAC yöntemi referans yöntem olarak kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, fenolik antioksidanların peroksil radikallerine karşı süpürme aktivitesini taramak ve linoleik asit emülsiyonlarının AAPH kaynaklı oksidasyonu sırasında oluşan hidroperoksitleri tespit etmek için yeni bir nişasta bazlı altın nanopartikül kolorimetrik sensör kullanılmıştı. Nişasta, sensör nanopartiküllerini Au (III) iyonlarından hazırlamak için yeşil bir indirgeyici ve sabitleyici ajan olarak kullanılmıştır. Sensörün ana mekanizması, peroksil radikallerinin ve hidroperoksitlerin iyodür indirgemesinin bir sonucu olarak ortaya çıkan triiyodür iyonlarının adsorpsiyonu ile nişasta stabilize edilmiş altın nanopartiküllerin toplanmasına dayanır. AuNP agregasyonu, $ROO\cdot$ / $ROOH$ 'un iyodür ile azaltılmasıyla gözlemlendi, nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans dalga boyunda kırmızı bir kaymaya ve yoğun absorbansa neden olurken, antioksidanlar bu absorbansı azalttı ve peroksil radikal süpürücü antioksidan aktivitesinin dolaylı bir tahminini sağlamıştır. Bu nanosensör, lipofilik antioksidan α -tokoferolün uygulanabilirliği açısından klasik FL bazlı ORAC yönteminden daha üstün olduğu öne sürülmüştür. Önerilen algılama tekniği, düşük maliyet, basitlik, uyumluluk, esneklik ve minyatürleştirme ve otomasyona uygunluk açısından florometri ve elektron spin

rezonansı (ESR) gibi sofistike tekniklere göre bazı avantajlara sahiptir. Bir başka avantaj, lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için problemlerin çoğu uzman tarafından biyokimyasal olarak alakasız reaksiyonlara dayanan yapay problemlerden daha gerçekçi olduğu düşünülmektedir. Gıda maddeleri ve biyolojik numuneler gibi çeşitli matrislerin antioksidan Potansiyeli, Bu nanosensör kullanılarak basit bir spektrofotometre veya kolorimetre kullanılarak uygun ve ekonomik olarak tanımlanabilir ve Yöntem klinik prosedürlere rahatlıkla uyarlanabilir.

2.6 PEROKSİL RADİKAL SÜPÜRME AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI YÖNTEM

Bildiğimiz kadarıyla, Peroksil Radikal Süpürme Aktivitesini (PSC) belirlemek amacıyla GSH ile stabilize edilen floresans histidin AuNP'nin peroksil radikal probu olarak uygulanması konusunda hiçbir çalışma yapılmamıştır. Mevcut yöntemler, sıkı çalışma koşullarında gerçekleşen ve çok zahmetli olan hidrojen atomu transfer reaksiyonlarına dayanmaktadır. Bu nedenle, peroksil radikal süpürme aktivitesini ölçmek için daha kolay ve daha hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında, yukarıda vurgulanan veya literatürde mevcut olan yöntemlerin çeşitli sınırlamalarını ortadan kaldıran altın nanoparçacık esaslı spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikal süpürme aktiviteleri hesaplanmış ve referans yöntem olarak seçilen Krosin Ağartma Yöntemi'nden elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Bu önerilen yöntem ile peroksil radikal süpürmeye dayalı antioksidan aktivite tayini için seçici, hassas ve kararlı bir altın nanoparçacık prob kullanılarak mevcut yöntemlerden daha avantajlı bir yöntem literatüre sunuldu. |

3 MALZEME VE YÖNTEM

3.1 MALZEME

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal maddelerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde E512 Metrohm Herisau pH-metre, inkübasyon işlemi için Memmert WNB 22 (Schwalbach, Almanya) su banyosu, absorban ölçümlerinde Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi (Mulgrave, Victoria, Avustralya), floresans ölçümlerinde Varian Cary Eclipse model spektrofotometre (Mulgrave, Victoria, Avustralya), ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, bitki çaylarının mikrodalga ekstraksiyonu için Milestone Ethos One ekstraksiyon sistemi kullanılmıştır. Nanoparçacıkların boyut ve şekillerini belirlemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (STEM) (FEI QUANTA FEG 450) kullanıldı.

3.1.2 Kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler: 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorür (AAPH), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidroklorik asit (HCl), sülfat asidi (H_2SO_4), mutlak etil alkol (EtOH saflık $\geq 99.9\%$), tetrakloroaurat asidi çözeltisi (HAuCl_4), L-glutatyon (GSH), histidin, krosin, kuersetin (QR), ferulik asit (FRA), epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC), protokateşik asit (PA), rosmarinik asit (RA), epikateşin (EC), kateşin (CAT) ve fetal bovine serumdur. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Yeşil çay (*Camellia sinensis*) ve adaçayı (*Salvia officinalis*) Arifoğlu Baharat Gıda San. Ltd. Sti.'den temin edilmiştir.

3.2 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.2.1 Altın Nanoparçacık Esaslı Peroksil Radikal Süpürme Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Altın nanoparçacık esaslı peroksil radikal süpürme aktivite tayin yönteminde prob olarak kullanılan altın nanoparçacıkların sentezi için suda hazırlanan histidin (0.1163 g, 30mL) ve H₂AuCl₄ (68.9 µL, 10mL) çözeltileri karıştırıldı ve 25°C’de 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 10 mL 30 mM GSH çözeltisi ilave edilerek inkübasyon işlemine aynı şartlar altında 12 saat boyunca devam edildi [10,56]. 30 mM GSH için: 0.2711 g tartım alınıp 10 mL distile su ekleyerek hazırlandı.

Peroksil radikallerinin üretimi için 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorür (AAPH) çözeltisi 20 mM olacak şekilde 0.2711 g tartım alınıp distile su ile 50 mL’ye tamamlanarak hazırlandı.

3.2.2 Krosin Ağartma Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Krosin çözeltisi 5.0×10^{-4} M olacak şekilde 0.024 g tartım alınıp distile su ile 50 mL’ye tamamlanarak hazırlandı. AAPH (200 mM) çözeltisi için 1.356 g tartım alınıp 0.2 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tampon çözeltisi (pH=7.4) ile 50 mL’ye tamamlanarak hazırlandı. 0.2 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tampon çözeltisi (pH=7.4) distile su ile [10,56] hazırlandı.

3.2.3 Peroksil Radikal Süpürücü Bileşiklerin Hazırlanması

Peroksil radikal süpürme aktiviteleri belirlenmek istenen polifenolik bileşik çözeltileri, çalışma aralığındaki konsantrasyonlarda %10 (v/v) etanolde (EtOH) günlük olarak hazırlandı.

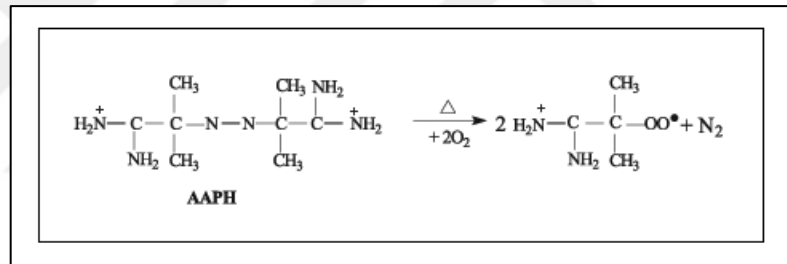
Yeşil çay ve adaçayı örnekleri mikrodalga ekstraksiyon yöntemi (MAE) kullanılarak ekstrakte edildi. Mikrodalga ekstraksiyon, teflon (PTFE) kaplarda, fiber optik sıcaklık kontrol sistemi ve kapalı fırın sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Herbir bitki çayından 1.0 g tartım alınarak üzerine 20 mL % 80 (v/v) etanol çözeltisi ilave edildi. Teflon kaplara hazırlanan bu karışımın içerisine manyetik karıştırıcı konulup simetrik olarak cihaz içerisine yerleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sırasında 500 W güç uygulanarak 3 dakikada çalışma sıcaklığı olan 80 °C’ye ulaşıldı. Bunu takip eden 5 dakika içerisinde sıcaklık 80 °C’de sabit tutuldu ve son 3 dakikada içerisinde

soğumaya bırakılarak ekstraksiyon işlemi 11 dakikada tamamlandı. Elde edilen yeşil çay ve adaçayı ekstraktları adı süzgeç kağıdından süzildikten sonra analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı poliester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilip uygun oranda %10 (v/v) EtOH ile seyreltildi. Sentetik serum çözeltisi kullanılan yöntemle göre 1 mL stok çözeltiden alınıp 20 mL %10 (v/v) EtOH ile tamamlanarak kullanıldı. Kateşin katkılı sentetik serum örneğine için; artan kateşin ($4 \times 10^{-4} \text{M}$) hacmi, dört farklı tüpte 0.5 mL 1:20 oranında seyreltilmiş sentetik serum örneğine eklenerek uygulandı.

3.3 PEROKSİL RADİKAL SÜPÜRME AKTİVİTE TAYİNİNDE UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1 Peroksil Radikali Üretimi

Peroksil radikalleri AAPH'ın 37 °C'de termal bozulması sonucunda elde edilmiştir [78].



Şekil 3.1: AAPH'ın termal bozulması sonucu peroksil radikal oluşumu

3.3.2 Altın Nanoparçacık Esaslı Peroksil Radikal Süpürme Aktivite Tayin Yöntemi

Peroksil radikali süpürme aktivitesi için geliştirilen AuNP esaslı yöntemle göre son hacmi 3 mL olan reaksiyon karışımı: 1 mL AuNP çözeltisi, (1.7-x) mL H₂O, x mL farklı konsantrasyonlardaki süpürücü bileşik ve 0.3 mL AAPH çözeltisi (20µM) içermektedir. Gerçek örneklerin (bitki çayları veya sentetik serum çözeltisi) süpürücü olarak kullanılması durumunda uygun oranda seyreltilme yapılarak yöntem uygulanmıştır. Reaksiyon karışımı 37 °C'lik su banyosunda 30 dakika süresince inkübe edildi. Daha sonra bu inkübasyon çözeltilerinin intensite değerleri ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 502 \text{nm}$) ölçüldü.

1 mL AuNP + x mL süpürücü bileşik + (1.7-x) mL H₂O + 0.3 mL AAPH

$$V_{\text{toplam}}: 3 \text{ mL} \quad (3.1)$$

Bu yöntemle tüm süpürücü bileşiklerin belirtilen konsantrasyon düzeyinde % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{I_1 - I_0}{I - I_0} \times 100 \quad (3.2)$$

AuNP probunun başlangıç floresans intensitesi, I_0 ve I_1 sırasıyla süpürücü bileşik yokluğunda ve varlığında inkübasyon ortamında bozunmadan kalan AuNP probuna ait ($\lambda_{\text{ex}} = 450\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 502 \text{ nm}$) intensite değerleridir. Tüm süpürücü bileşikler için hesaplanan % inhibisyon değerleri ile $C_{\text{süpürücü}}$ değerleri kullanılarak çizilen grafikten elde edilen doğru denkleminde peroksil radikal süpürme aktiviteleri IC_{50} değeri olarak hesaplandı.

3.3.3 AuNP Probuna Ait İntensite Değerlerinin İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Değişimi

AuNP probunun tek başına, kateşin (süpürücü bileşik) varlığında ve yokluğunda (referans çözelti) hazırlanan inkübasyon çözeltilerinin 30 dakika süresince zamana bağlı olarak intensite değerlerindeki değişimler izlenmiştir. Buna göre (a) 1 mL AuNP çözeltisi, (b) 1 mL AuNP çözeltisi + 0.3 mL AAPH (20 mM), (c) 1 mL AuNP çözeltisi + x mL kateşin ($4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) + 0.3 mL AAPH (20 mM) karışımları alınarak her bir karışıma son inkübasyon çözelti hacmi 3 mL olacak şekilde gerekli su ilaveleri yapılarak 37 °C'de inkübe edilmiştir.

3.3.4 Krosin Ağartma (Beyazlatma) Yöntemi

Referans yöntem olarak seçilen Krosin Ağartma Yöntemine [77] göre 0.5 mL krosin (0.5 mM), x mL farklı konsantrasyonlardaki (10 μM ve 20 μM arasında) süpürücü çözeltisi, (4.3-x) mL distile su, 0.2 mL AAPH çözeltisi (200mM) ilave edilerek son hacim 5 mL'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı 37 °C'lik su banyosunda 30 dakika süresince inkübe edildi. Daha sonra bu inkübasyon çözeltilerinin absorbans değerleri 440 nm dalgaboyunda distile suya karşı ölçüldü.

0.5 mL krosin + x mL süpürücü bileşik + (4.3-x) mL H₂O + 0.2 mL AAPH

$$V_{\text{toplam}}: 5 \text{ mL} \quad (3.3)$$

Bu yöntemle tüm süpürücü bileşiklerin belirtilen konsantrasyon düzeyinde % inhibisyon değerleri Eşitlik 'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_1 - A_0}{A - A_0} \times 100 \quad (3.4)$$

A, krosin probunun başlangıç absorbansı, A₀ ve A₁ sırasıyla süpürücü bileşik yokluğunda ve varlığında reaksiyon ortamında bozunmadan kalan krosin probuna ait ($\lambda = 440 \text{ nm}$) absorbans değerleridir. Tüm süpürücü bileşikler için hesaplanan % inhibisyon değerleri ile C_{süpürücü} değerleri kullanılarak çizilen grafikten elde edilen doğru denkleminde peroksil radikal süpürme aktiviteleri IC₅₀ değeri olarak hesaplandı.

3.3.5 AuNP Probunun Seçicilik Ölçümü

Geliştirilen yöntemde florimetrik prob olarak kullanılan AuNP nin peroksil radikallerine karşı seçiciliğinin belirlenebilmesi için önerilen probun diğer önemli reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı süpürme aktivitesi de incelenmiştir. Bu amaçla AuNP probunun 37°C'de 30 dakika boyunca farklı reaktif oksijen türleri ile inkübasyon sonrasında floresans intensite değerindeki ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 502 \text{ nm}$) değişim incelendi. AuNP yönteme göre son hacmi 3 mL olan reaksiyon karışımı: 1 mL AuNP çözeltisi, (2-x) mL H₂O ve x mL ROS çözeltisi içermektedir. 0.3 ml hidrojen peroksit H₂O₂ (20mM), 0.3 mL hipokloröz asit ⁻OCl (5.7 mM), %10 (v/v) NaOCl çözeltisinin pH'sının 0.6 M H₂SO₄ dolgusu ile 6.2'ye ayarlanıp 100 mL'ye tamamlandı ve konsantrasyonu, 100 M⁻¹ cm⁻¹ molar absorplama katsayısı kullanılarak 235 nm'de absorbansın ölçülmesiyle belirlendi. 0.5 mL H₂O₂ (20 mM) ile 0.5 mL NaNO₂ (20 mM) karıştırılarak 0.4 ml peroksinitrit ONOO⁻ (20 mM) hazırlandı. 0.6 ml singlet oksijen ¹O₂ çözeltisi (20 mM), 1 ml H₂O₂ (20 mM) ve 1 ml NaClO₄ (20 mM) ile karıştırılarak hazırlanmıştır. PMS-NADH (fenazin metasülfat-nikotinamid dinükleotid) sistemi ile süperoksit anyon radikalini oluşturuldu. 1 mL NADH (468 µM) ile 0.5 mL PMS (60 µM) karıştırılarak süperoksit anyon radikalini oluşturuldu.

3.3.6 Verilerin İstatistiksel Analizi

Ortalama ve standart hatanın hesaplanması için Excel yazılımı (Microsoft Excel 2013) kullanıldı. Her bir antioksidan maddenin üç kopyası için ölçümler alındı ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak rapor edildi. En uygun çizginin eğimini (m) ve eğimini (c) belirlemek için Excel yazılımında yüzde inhibisyonu konsantrasyonuna karşı doğrusal korelasyonu çizildi. Veri değerlendirmesi, Windows için SPSS yazılımı (sürüm 13) kullanılarak iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. |



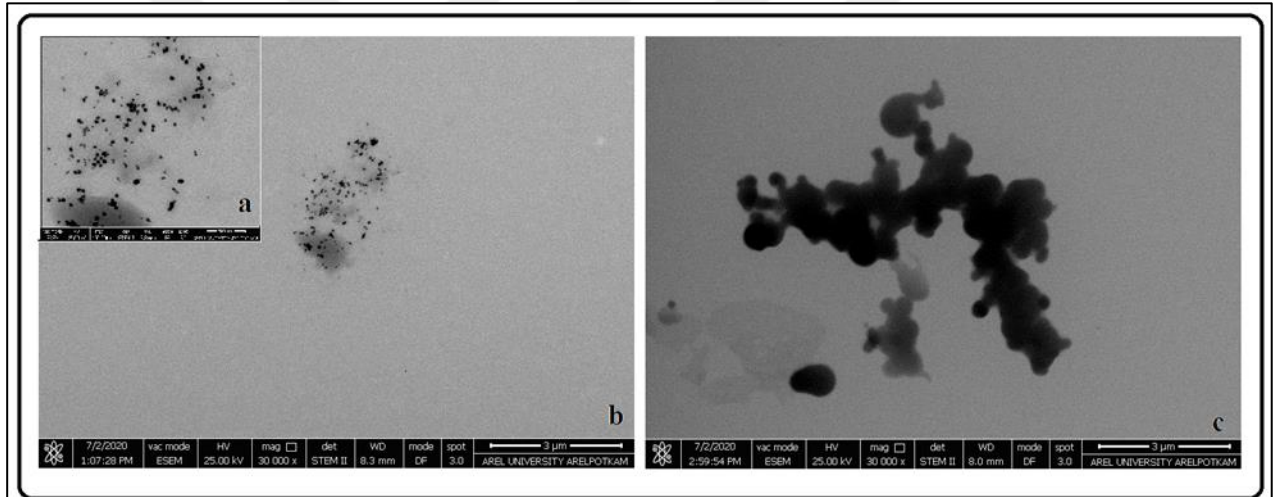
4 BULGULAR

4.1 ÖNERİLEN AuNP PROBU VE OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

4.1.1 AuNP Probusunun Özellikleri

AuNP'nın floresan yoğunluğunda hafif bir düşüşün yanı sıra, AuNP probu oda sıcaklığında karanlık bir yerde tutulduğunda başka bir değişiklik yoktu. Önerilen AuNP probunun TEM görüntüsü

Şekil 4.1'de verilmektedir. Gösterdiği gibi AuNP'nın ortalama çapın 20 nm olmaktadır.

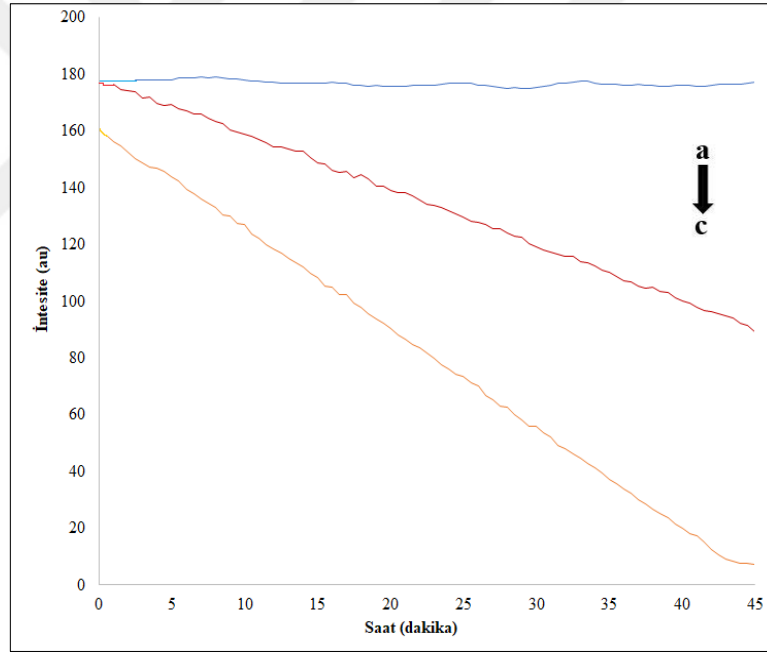


Şekil 4.1: Altın nanoparçacık probunun tek başına (a: 500 nm; b: 3 μm) ve peroksil radikalleri varlığında (c: 3 μm) elde edilen TEM görüntüleri

Bu sonuçlara göre başarılı bir şekilde hassas ve kararlı bir AuNP probu sentez edildi ve antioksidan örneklerde PSC'yı değerlendirmek için kullanıldı. Bu AuNP, histidin ve GSH kullanılarak çevre dostu bir yöntemle sentezlendi.

4.1.2 İnkübasyon Süresi

Geliştirilen AuNP probunun, tek başına, süpürücü bileşik (kateşin) varlığında ve yokluğunda intensite değerleri ($\lambda_{ex} = 450\text{nm}$, $\lambda_{em} = 502\text{ nm}$) 45 dakika boyunca izlenerek inkübasyon işlemi için uygun süre 30 dakika olarak belirlenmiştir. Şekil 4.2’de göz önüne alınarak intensite azalması zamanla görülmektedir. İnkübasyon süresince yalnız AuNP prob çözeltisine ait intensite değerlerinde belirgin bir değişim görülmemektedir. Kateşin varlığında ve yokluğunda zamanla intensite değerlerinde bir azalma görülmektedir. Ancak bu azalma süpürücü bileşik varlığında daha düşüktür. Süpürücü bileşik varlığında ve yokluğunda ölçülen intensite değeri arasındaki fark 30 dakika sonunda peroksil radikali süpürme aktivitesinin ölçümü için yeterlidir.

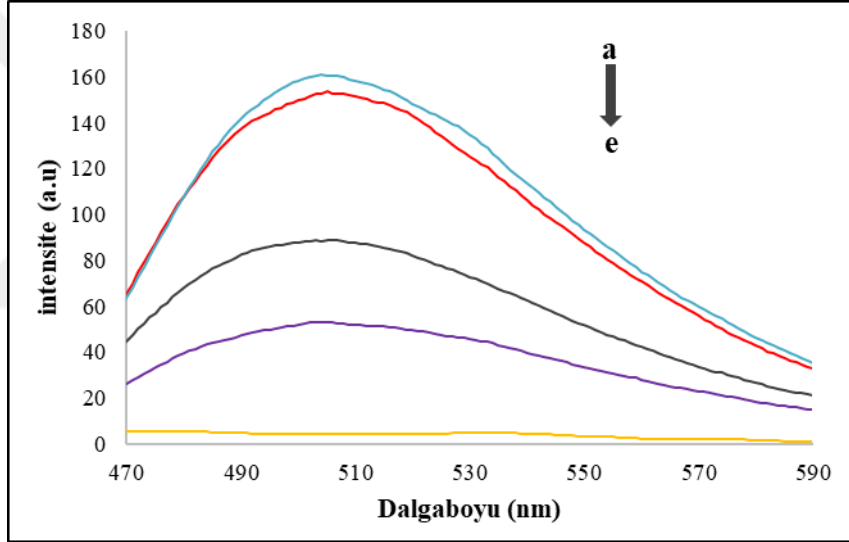


Şekil 4.2: (a) AuNP probunun tek başına, (b) süpürücü bileşik (kateşin) varlığında ve (c) yokluğunda (referans) inkübasyon süresine bağlı olarak intensite değerlerinin değişim grafiği.

4.2 ÇEŞİTLİ SÜPÜRÜCÜ BİLEŞİKLERİN PEROKSİL RADİKALİ SÜPÜRME AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

4.2.1 Peroksil Radikal Üretim Sistemi ile AuNP Probu Arasındaki Etkileşim

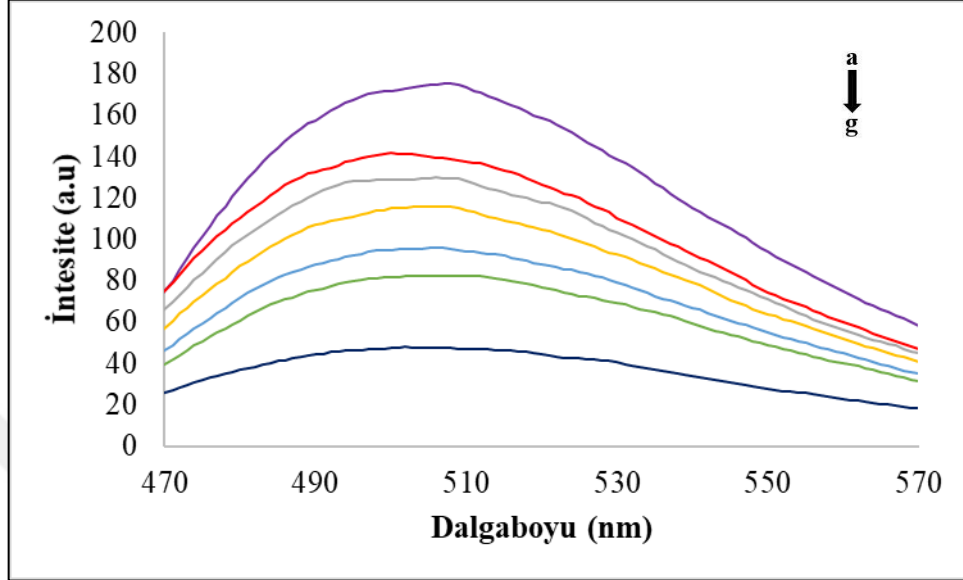
Reaksiyon karışımında bulunan AuNP probuna ait 500 nm dalgaboyunda ölçülen floresans şiddetine gerek AAPH sisteminin gerekse peroksil radikali süpürme aktivitesi belirlenmek istenen süpürücü bileşiğin (örneğin, kateşin) bir etkisinin olmadığını göstermek amacıyla inkübasyon çözeltisindeki bileşenlerin tek tek, ikili veya üçlü karışımlarına ait emisyon spektrumları çizilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: AuNP probunun farklı karışımların emisyon spektrumları; (a) AuNP probu tek başına, (b) AuNP + 66.6 μM CAT, (c) AuNP + 66.6 μM CAT + 2 μM AAPH, (d) AuNP + 0.3 mL 20 mM AAPH, and (e) 66.6 μM CAT and 2 μM AAPH.

Yeni geliştirilen florometrik yöntemde çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikali süpürme aktivitelerini hesaplamak için bu süpürücü bileşiklerin değişen konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına ilave edilmesiyle inkübasyon işlemi sonucunda reaksiyon ortamında kalan AuNP probunun intensite değerleri ($\lambda_{\text{eks}}=450$ nm, $\lambda_{\text{em}}=500$ nm) ölçüldü. Floresan emisyon spektrumu, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterildiği gibi 470 ila 600 nm arasında kaydedildi. Her bir süpürücü bileşiğin peroksil radikali süpürme aktiviteleri (% inhibisyon) Eşitlik 3.2’ye göre hesaplanmıştır.

Süpürücü bileşik olarak kullanılan antioksidanlardan kateşinin varlığında AuNP probu için elde edilen emisyon spektrumu Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Peroksil radikali varlığında ve yokluğunda (a) AuNP probu tek başına, (b) 227 μM CAT, (c) 160 μM CAT, (d) 107 μM CAT, (e) 53.3 μM CAT, (f) 13.3 μM CAT and (g) 0 μM CAT (referans) AuNP probunun emisyon-floresans spektrumları.

Kateşin için geliştirilen AuNP esaslı yöntemle göre Eşitlik 3.4 ile hesaplanan % inhibisyon değerleri Tablo 4.1'da gösterilmiştir.

Tablo 4.1: AuNP esaslı florimetrik yöntemle ait % İnhibisyon – C_{CAT} değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (μM)	İntensite (I_1) (a.u)	% İnhibisyon
13.3	83	22.48
53.3	96	39.53
107	114	47.28
160	129	61.36
227	141	70.45
$I = 180 \quad I_0 = 48$ $y = 0.21 C_{\text{CAT}} + 25.47$ ($y = \% \text{ İnhibisyon}$) $r = 0.9922$		

Elde edilen % inhibisyon değerleri ile süpürücü bileşiğin değişen konsantrasyonları arasında oluşturulan grafiğe ait doğru denklemi kullanılarak her bir süpürücü bileşiğin IC_{50} değeri aşağıda gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

$y = 50$ (% 50 inhibisyon) için

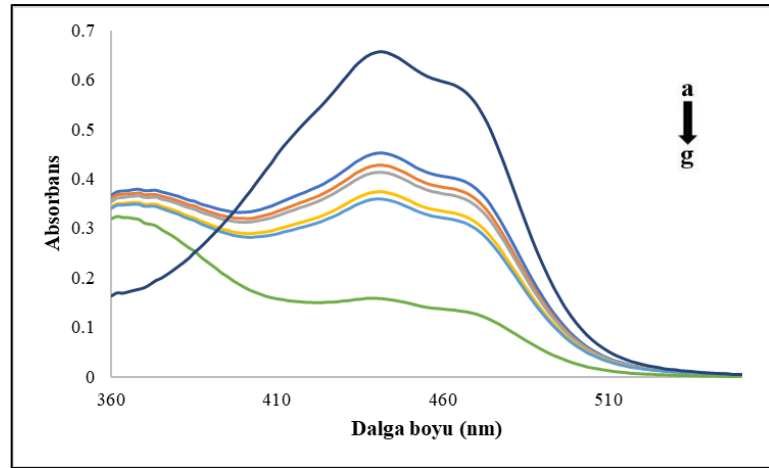
$$50 = 0.21 C_{CAT} + 25.47$$

$$C_{CAT} = 116.82 \mu M$$

$$IC_{50} = 116.82 \mu M$$

4.2.2 Krosin Ağartma Yöntemiyle Çeşitli Süpürücü Bileşiklerin IC_{50} Değerlerinin Hesaplanması

Çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikal süpürme aktivitelerinin belirlenmesinde referans yöntem olarak Krosin Ağartma Yöntemi kullanılmıştır. Süpürücü bileşiğin konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon ortamında yükseltgenmeden kalan krosinin 440 nm dalgaboyunda absorbans değeri ölçüldü. Katesin varlığında Krosin Ağartma Yöntemi ile elde edilen görünür alan spektrumu Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Krosin yöntemine göre Peroksil radikali varlığında ve yokluğunda; (a) krosin sadece, (b) 8 μM CAT, (c) 7 μM CAT, (d) 5 μM CAT, (e) 3 μM CAT, (f) 1 μM CAT) ve (g) 0 μM CAT (referans) elde edilen görünür alan spektrumları.

Kateşin için Krosin Ağartma Yöntemine göre Eşitlik 3.4 ile hesaplanan % inhibisyon değerleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: % İnhibisyon – C_{CAT} değerleri ve doğru denklemi

C_{CAT} (μM)	Absorbans (A_1)	% İnhibisyon
1.0	0.3589	40.27
3.0	0.3799	44.49
5.0	0.4101	50.58
7.0	0.4272	54.03
8.0	0.4516	58.95
$A = 0.6553 \quad A_0 = 0.1591$ $y = 2.58 C_{CAT} + 37.30$ (y= % İnhibisyon) $r = 0.9924$		

Elde edilen % inhibisyon değerleri ile süpürücü bileşiğın değişen konsantrasyonları arasında oluşturulan grafiğe ait doğru denklemi kullanılarak her bir süpürücü bileşiğın IC_{50} değeri aşağıda gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

$y = 50$ (% 50 inhibisyon) için

$$50 = 2.58 C_{CAT} + 37.30$$

$$C_{CAT} = 4.92 \mu\text{M}$$

$$IC_{50} = 4.92 \mu\text{M}$$

Geliştirilen AuNP esaslı yonteme dayanarak IC_{50} olarak ifade edilen PSC ölçümlerinin sonuçları referans yöntem olan krosin yöntemine göre karşılaştırıldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: AuNP esaslı yöntem ve Krosin yöntemi ile elde edilen çeşitli süpürücü bileşiklerin PSC değerleri (N= 5 veya 7)

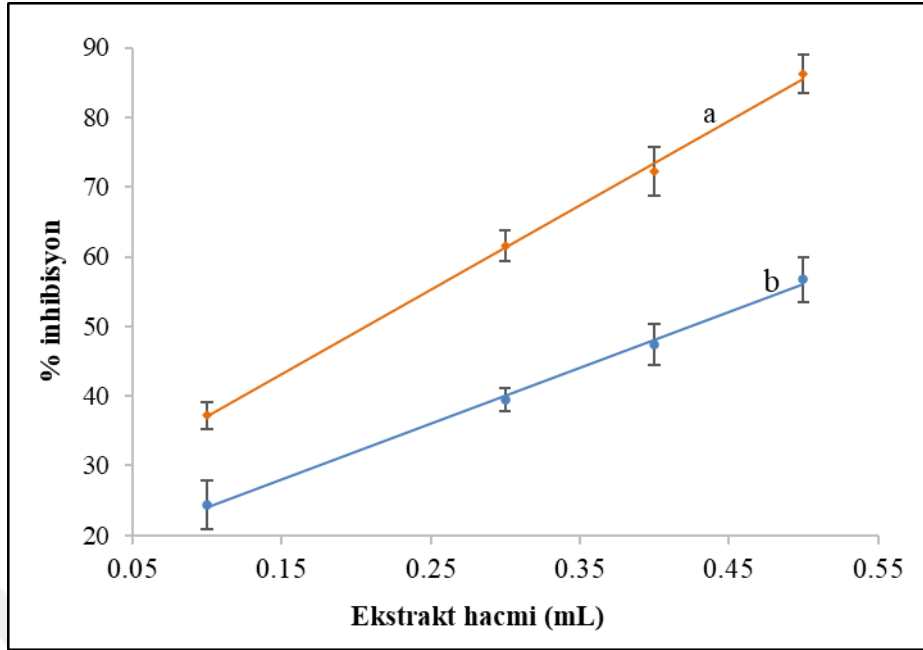
Süpürücü bileşikler	AuNP esaslı yöntemle göre lineer eşitlik ve korelasyon katsayısı	AuNP esaslı yöntemle göre hesaplanan IC ₅₀ değerleri (µM)	Krosin Ağartma Yöntemine göre hesaplanan IC ₅₀ değerleri (µM)
Epigallokateşingallat (EGCG)	$y = 1.10x + 3.80$ $r = 0.9897$	4.20±0.19	0.51±0.07
Epigallokateşin (EGC)	$y = 1.72x + 21.97$ $r = 0.9828$	16.30±0.74	3.39±0.37
Kuersetin (QR)	$y = 0.94x + 18.47$ $r = 0.9909$	33.54±1.68	3.11±0.17
Rosmarinik asit (RA)	$y = 0.88x + 16.99$ $r = 0.9929$	37.51±1.85	4.40±0.28
Epikateşin (EC)	$y = 0.58x + 6.48$ $r = 0.9938$	75.03±3.75	4.82±0.61
Kateşin (CAT)	$y = 0.21x + 25.47$ $r = 0.9922$	116.82±7.14	4.92±0.04
Protokateşuik asit (PA)	$y = 1.18x + 8.60$ $r = 0.9959$	350.80±11.31	31.80±3.93
Ferulik asit (FRA)	$y = 1.16x + 0.40$ $r = 0.9987$	427.59±10.78	219.63±11.42

Ortalama ± SD (n=3)

(P = 0.05 için F_{deneysel} = 0.1486, F_{kritik (tablo)} = 3.79, F_{deneysel} < F_{kritik (tablo)})

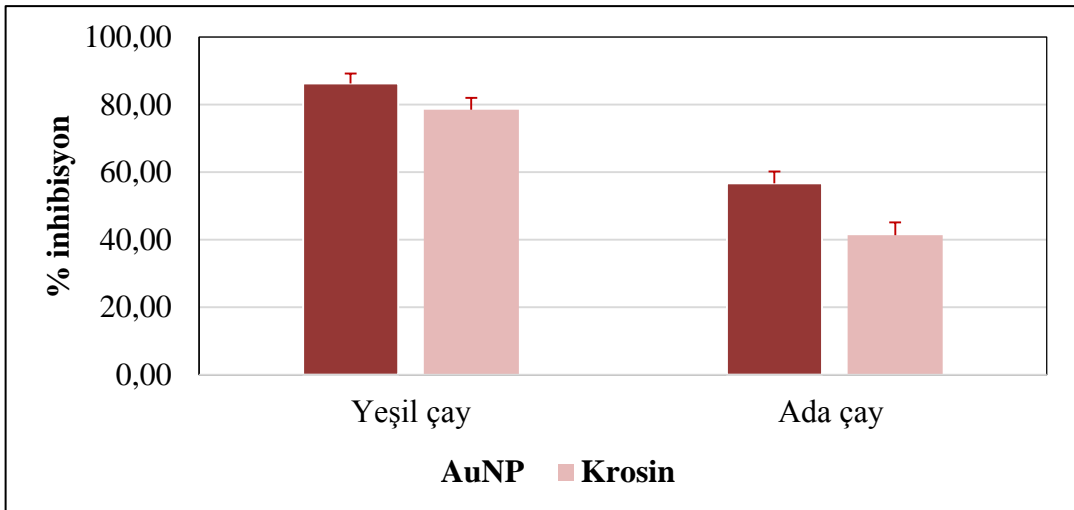
4.2.3 Bazı Gerçek Örneklerin Peroksil Radikali Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

AuNP probu esaslı geliştirilen florometrik yöntem ile bitki çayı ekstraktları ve sentetik serum örneği için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. AuNP probu esaslı geliştirilen florometrik yöntem ile hesaplanan % inhibisyon değerleri ile bitki çayı ekstrakt hacmi arasındaki ilişki Şekil 4.6’te gösterilmiştir.



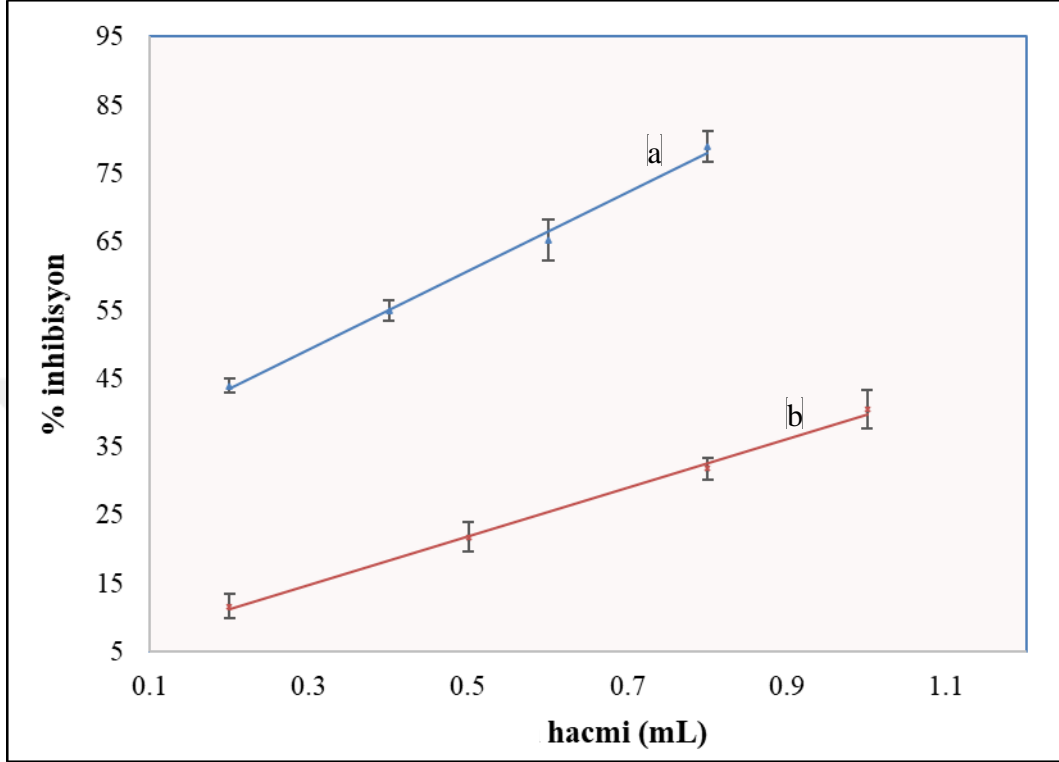
Şekil 4.6: 1:40 oranında seyreltilmiş yeşil çayı (a) ve ada çayı (b) ekstratlarının % inhibisyon değerleri ile ekstrakt hacmi arasındaki ilişki.

Ayrıca bu bitki çayı ekstraktlarının AuNP probu kullanılarak yeni geliştirilen florometrik yöntem ve referans yöntem olan Krosin Ağartma Yöntemlerine göre hesaplanan % inhibisyon değerleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: AuNP esaslı florimetrik yöntem ve Krosin yöntemine göre 1:40 oranında seyreltilmiş 0.5 ml yeşil çay ve ada çay ekstraktlarının % inhibisyon değerleri.

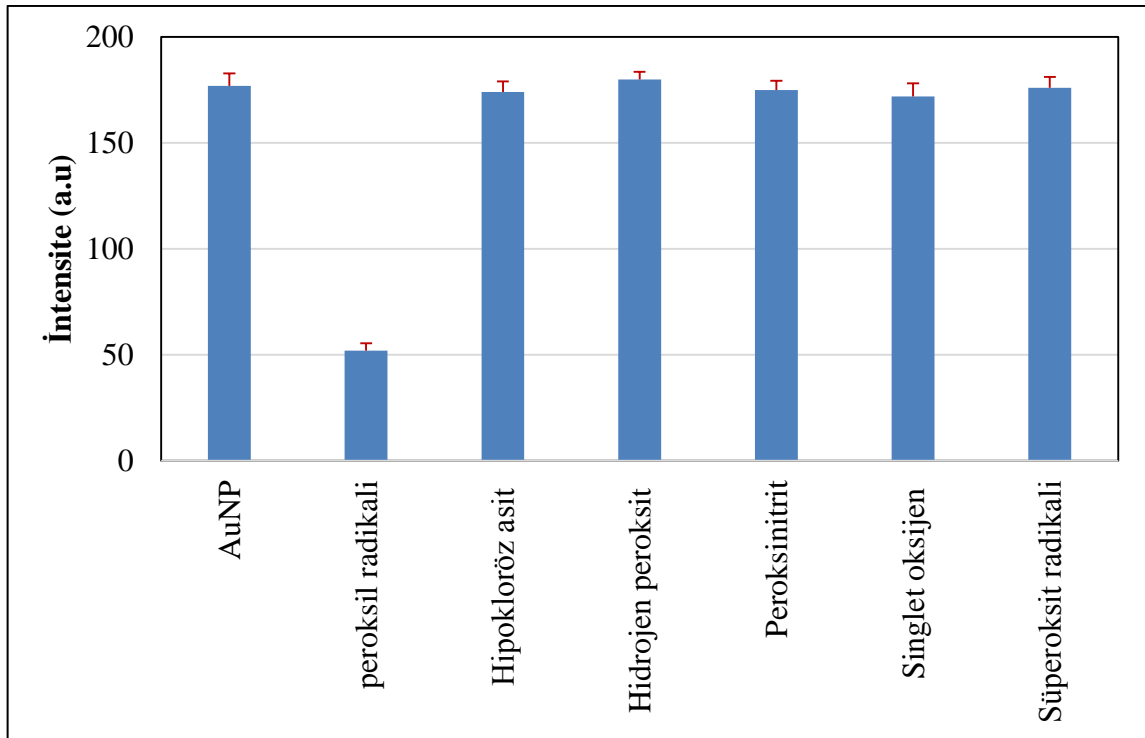
Kateşin katkılı ve katkısız sentetik serum örneğinin peroksil radikal süpürme aktivitesi AuNP esaslı florimetrik yöntemi uygulanarak % inhibisyon cinsinden Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: AuNP esaslı florimetrik yöntem ile kateşin katkılı ve katkısız sentetik serum örneğinin peroksil radikal süpürme aktivitesi; (a) 0.5mL 1:20 seyreltilmiş sentetik serum örneğine kateşin ($4 \times 10^{-4}M$) katkılı, (b) Sentetik serum (1:20).

4.2.4 Önerilen AuNP Probonun Seçiciliği

Geliştirilen yöntemde kullanılan AuNP esaslı florimetrik probun bazı önemli reaktif oksijen türlerine (peroksil radikali, hipokloröz asit, hidrojen peroksit, peroksinitrit, singlet oksijen ve süperoksit radikali) karşı süpürme aktivitesi incelenmiştir. Bunun için hidrojen peroksit, süperoksit anyon radikali, singlet oksijen, peroksinitrit anyonu ve hipokloröz asit varlığında AuNP probunun floresans intensitesindeki değişim incelendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: AuNP probunun çeşitli reaktif oksijen türleri varlığında floresan intensitesindeki değişim. Ortalama \pm SD (n=3).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında bazı antioksidan bileşiklerin peroksil radikal süpürme aktivitelerini belirlemek için altın nanoparçacık esaslı florimetrik yöntem geliştirilmiştir. Peroksil radikali 2,2'-azobis (2- metil propionamidin) dihidroklorür (AAPH)'ün 37 °C'de termal bozunması ile üretilmiştir [78]. Yeni geliştirilen yöntemde dedektör molekül olarak altın nanoparçacıklar kullanılmıştır. Floresans altın nanoparçacık'ın sentezi tek adım sentezi olup L-histidin hem indirgeme ajanı hem de stabilizatör olarak ikili rol oynamaktadır. L-histidinde yer alan imidazol grubu altını indirgemekte, karbonil grubu ise koruyucu ajan olarak davranmaktadır [10]. Çözelti içerisindeki H₂AuCl₄ ve L-histidin karıştırılarak hazırlanan altın nanoparçacıkların floresans şiddeti GSH ilavesi ile önemli miktarda artmaktadır. Zhang ve arkadaşları (2014), güçlü Au-S bağının bir sonucu olarak ortama eklenen GSH'ın AuNP'in yüzeyinde bulunan histidin molekülleri ile kademeli olarak bir ligand değişimine yol açtığını ve AuNP'in floresans şiddetindeki önemli artışın bu ligand değişiminden kaynaklandığını öne sürmüştür [10]. Peroksil radikal süpürme aktivite tayini için prob olarak kullanılan altın nanoparçacıkların eksitasyon (uyartım) ve emisyon (yayınım) dalgaboyları sırasıyla 450 nm ve 500 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Hazırlanan AuNP'in Taramalı Elektron Mikroskobu (STEM) görüntüleri (Şekil 4.1) düzgün dağılmış nanoparçacıkların ortalama 20 nm boyutunda monodisperse ve küresel şekilde olduğu gösterdi.

Altın nanoparçacık probunun peroksil radikalleri ile reaksiyonu sonucunda floresans şiddetinde bir azalma görülmektedir. Reaksiyon ortamına süpürücü madde eklendiğinde, peroksil radikalleri eş zamanlı olarak altın nanoparçacık probu ve süpürücü madde ile reaksiyona gireceğinden probun floresans şiddetindeki düşüş miktarı da azalacaktır. Altın nanoparçacıkları oluşturan glutatyonun literatürden iyi peroksil radikal süpürücü olduğu bilinmektedir. Altın nanoparçacıklar'ın içerdiği glutatyon peroksil radikalleri ile reaksiyona girmesi floresans şiddetindeki düşüşün sorumlusu olarak düşünülmektedir.

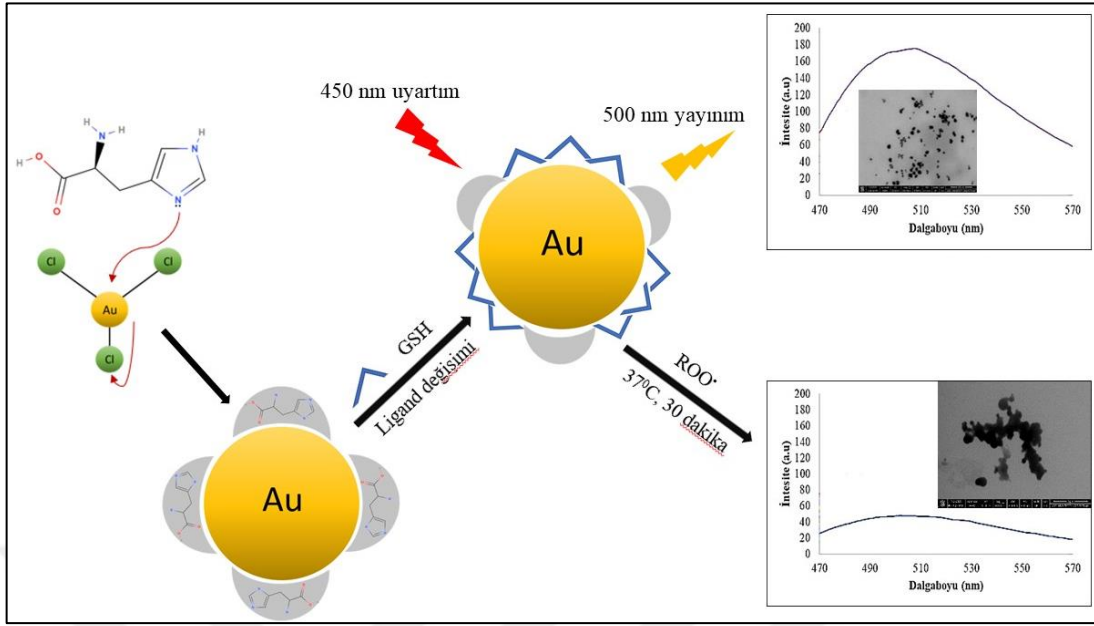
Altın nanoparçacık probunun floresans şiddetindeki değişimi süpürücü madde varlığında ve yokluğunda zamanın fonksiyonu olarak Şekil 4.4'te verilmiştir. Kateşin varlığında ve yokluğunda ölçülen intensite değerleri incelendiğinde optimum inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Bu süre içerisinde sadece altın nanoparçacıklar içeren örneğin floresans

şiddetinde kayda değer bir azalma gözlenmezken (Şekil 4.2), peroksil radikali içeren reaksiyon karışımlarına ait floresans şiddetleri belirgin şekilde azalmıştır. Otuz dakikalık inkübasyon süresi sonunda süpürücü varlığında ve yokluğunda ölçülen floresans şiddetleri arasındaki fark süpürücü bileşiğe ait % inhibisyon değerini hesaplamak için yeterlidir (Şekil 4.2).

Süpürücü bileşiklerin peroksil radikal süpürme aktivitelerini belirlemek için hazırlanan inkübasyon karışımında ölçülen floresans şiddetinin sadece florimetrik prob olan altın nanoparçacıklara ait olduğunu ve reaksiyon ortamında bulunan diğer maddelerin herhangi bir girişim etkisi olmadığını göstermek amacıyla reaksiyon karışımındaki maddelerin ikili, üçlü karışımları hazırlanarak floresans ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.3).

Peroksil radikal süpürmesine dayalı antioksidan aktivite tayini için florimetrik prob olarak kullanılan altın nanoparçacıkların eksitasyon (uyartım) ve emisyon (yayınım) dalgaboyları sırasıyla 450 nm ve 500 nm olarak belirlenmiştir. Altın nanoparçacık ait floresans şiddeti ($I=177$) peroksil radikalleri varlığında ($I_0=48$) düşüş göstermektedir. Reaksiyon ortamına süpürücü madde eklendiğinde eş zamanlı olarak altın nano nanoparçacık esaslı proba ve süpürücü maddeye saldıracaktır (Şekil 5.1). Reaksiyon ortamında AAPH'ın termal bozunması ile üretilen peroksil radikallerinin bir kısmı süpürücü bileşik ile reaksiyona gireceğinden altın nanoparçacık probunun floresans şiddeti, reaksiyon ortamında süpürücü madde yokluğunda ölçülen floresans şiddetine göre daha yüksektir. Bu durum süpürücü varlığında ve yokluğunda altın nanoparçacık probunun floresans spektrumundan açıkça görülmektedir (Şekil 4.4). Artan süpürücü madde konsantrasyonu birlikte floresans şiddeti benzer şekilde artış göstermektedir. ROO^* , oksidasyon reaksiyonu yoluyla AuNP'a saldırmakta ve dolayısıyla floresan intensitesinde önemli bir kayba yol açmaktadır. Floresans intensitesindeki düşüş miktarının azalması, test edilen antioksidan bileşiğin peroksil radikali süpürme aktivitesine bağlıdır. Böylece çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikal süpürme aktiviteleri belirlenmiştir.

Bazı antioksidan bileşiklerin peroksil radikal süpürme aktiviteleri florimetrik altın nano nanoparçacık probu kullanılarak IC_{50} (%50 inhibe edici konsantrasyon) cinsinden başarıyla hesaplandı (Tablo 4.3).

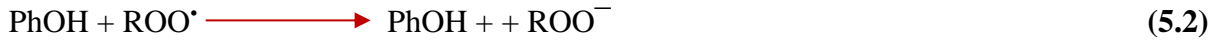


Şekil 5.1: HAuCl₄ ve histidininin karıştırılmasıyla hazırlanan AuNP'nin GSH ile floresan artışı gösterilmiştir

Geliştirilen yöntem ile elde edilen IC₅₀ değerleri referans yöntem olarak seçilen Krosin (ağartma) yöntemi ile elde edilen değerler ile karşılaştırıldı. Her iki yöntem ile elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 0.1486$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 3.79$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Çalışılan antioksidan bileşikler arasında hem geliştirilen hem de referans yöntem ile en düşük IC₅₀ değeri EGCG için bulunurken en yüksek IC₅₀ değeri ferulik asit için hesaplandı (Tablo 4.3).

Çelik ve arkadaşları [9] geliştirdikleri nişasta stabilize altın nanoparçacık esaslı kolorimetrik sensörü kullanarak bazı antioksidan bileşikler için peroksil radikal süpürme aktivitelerini belirlemiş ve benzer şekilde en iyi süpürme aktivitesine sahip olan antioksidan bileşiğin EGCG olduğunu rapor etmişlerdir. Altın nanoparçacık esaslı kolorimetrik sensör ile IC₅₀ değerlerine göre elde EGCG < QR < FRA sıralaması tez kapsamında geliştirilen florimetrik altın nanoparçacık probu kullanılarak elde edilen sıralamayla uyumludur.

Lambert ve Elias, EC, EGC, ECG ve EGCG'nin antioksidan aktivitesinin hidrojen atom transferi (HAT) veya tek elektron transferi (SET) üzerinden kaynaklandığını bildirmiştir [79].



Bu reaksiyonun hızı kateşinlerin bağ ayrılma entalpisine bağlıdır. Hidroksil grubundaki zayıf O-H bağı peroksil radikali ile daha büyük reaksiyon hızı demektir. Dolayısıyla bu reaksiyon hızının zincir ilerleme (çoğalma) basamağındaki reaksiyon hızından büyük olması zincir reaksiyonun sonlanmasına neden olmaktadır. Çay kateşinlerinin zincir kırma aktivitesinin hem HAT hem de SET mekanizmalarını içerdiği bilinmesine rağmen, HAT mekanizmalarının baskın olduğu ve D-halkalarını içeren galloil kısımları olan kateşinler durumunda bile bu aktivitenin B halkası ile sınırlı olduğu görülmektedir [79]. Wright ve arkadaşları temel çay kateşinlerinin radikal süpürme aktivite sıralamasını bağ ayrılma entalpisini esas alarak hesaplamış ve $\text{EC} \leq \text{ECG} < \text{EGC} \leq \text{EGCG}$ şeklinde rapor etmiştir [80]. Bu sıralama geliştirilen yöntem ile peroksil radikal süpürme aktivitesi belirlenen kateşin türleri arasındaki sıralamaya tamamen uymaktadır.

Geliştirilen yöntem kullanılarak yeşil çay ve ada çayı gibi bitki çayları ile sentetik serumun peroksil radikal süpürme aktiviteleri % inhibisyon olarak başarıyla belirlenmiştir. Önerilen AuNP ve klasik Krosin yöntemleri ile ölçülen hem yeşil çay hem de adaçayı çayı için PSC değerleri, bir bar diyagramında karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir (Şekil 4.7). AuNP esaslı yöntem ile bulunan PSC verilerinin doğrusal regresyon analizi 'de gösterilmiştir. Her iki çay numunesinin % inhibisyonu artan ekstrakt hacmi ile artmıştır (Şekil 4.6). Yeşil çayın yüzde inhibisyonu sayısal değeri adaçayına göre beş kat fazla olduğu görülmektedir. Bar diyagramındaki verilen veriler ile doğrusal regresyon analizindeki aynı sonucu vermektedir. Bitki çayları arasında hem geliştirilen yöntem hem de referans yöntem ile yeşil çayın peroksil radikal süpürme aktivitesi ada çayın peroksil radikal süpürme aktivitesinden yüksek bulunmuştur (Şekil 4.7). Yeşil çay kateşinler olarak bilinen flavan-3-ol grubunu yüksek miktarda içermesi ile karakterize edilmektedir. Yeşil çay içeriğinde en çok bulunan kateşin EGCG olarak bildirilmiştir [79]. EGCG'ın gerek bu tez çalışmasında uygulanan yöntemler gerekse literatürde mevcut yöntemler ile yüksek peroksil radikal süpürme aktivitesine sahip olması yeşil çayında yüksek peroksil süpürme aktivitesi göstermesini açıklamaktadır. Kamer ve arkadaşları tarafından DMPD probu kullanılarak çeşitli bitkisel çayların reaktif türleri süpürme etkinliği ölçülmüş ve yeşil çayın süpürme aktivitesi (% 46.80) ada çayının süpürme

aktivitesinden (% 34.44) daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [81]. Geliştirilen yöntem kullanılarak, kateşin katkılı ve katkısız sentetik serumun artan hacimlerine karşılık % inhibisyon değerleri başarılı şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.8). Sentetik seruma kateşin katkısı yapıldığında % inhibisyon ve hacim arasında çizilen grafikler arasında paralellik görülmektedir. Bu paralellik serum örneği ile katkısı yapılan antioksidan bileşiğin enterfere edici hiçbir kimyasal etkileşim göstermedikleri anlamına gelmektedir. Serum örneğine yapılan kateşin ilavesi ile birlikte örneğin peroksil radikal süpürme aktiviteside beklenildiği gibi artış göstermiştir. Böylece geliştirilen yöntemin hem sentetik karışımlar için hem de gerçek karışımların peroksil radikal süpürme aktivitelerini belirlemede başarılı bir yöntem olduğunu görülmüştür.

Altın nanoparçacık esaslı probun peroksil radikali dışında diğer reaktif oksijen türleri ile etkileşimi Şekil 4.9'de görülmektedir. Altın nanoparçacık probunun 177 olan başlangıç intensite değeri peroksil radikalleri varlığında azalırken (I=52), hidrojen peroksit, hipokloroz asit, peroksinitrit anyonu, singlet oksijen, süperoksit anyon radikali gibi reaktif türler varlığında intensite değerinde bir azalma görülmemiştir.

Peroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite tayinin için florimetrik prob olarak kullanılan altın nanoparçacık sentez yönteminin kolaylığı (tüm deney prosedürlerinde organik sentez, redoks reaksiyonu, ayırma veya saflaştırma adımlarına gerek yoktur) ve sentez prosesi sırasında kullanılan tüm reaktanların çevre dostu olması gibi avantajları bulunmaktadır. Florimetrik prob olarak kullanılan altın nano nanoparçacık suda çözünebilir, oldukça kararlı ve üstelik sentez sırasında hiçbir toksik reaktif madde veya ağır metal kullanılmaması nedeniyle yararlı biyouyumluluk özelliklerine sahiptir [10]. Ayrıca, florimetrik prob olarak kullanılan altın nano nanoparçacık peroksil radikallerini tespit etmek için belirli bir hassasiyete ve yüksek seçiciliğe sahiptir. Peroksil radikali dışında diğer reaktif oksijen türlerine karşı çalışma koşulları altında reaktivite belirlenememiştir. Sonuç olarak, bu tez kapsamında histidin ve GSH kullanılarak çevre dostu bir yöntemle hızlı, seçici, kararlı ve florimetrik altın nanoparçacık probu sentezlenip çeşitli antioksidan bileşiklerin peroksil radikali süpürme aktiviteleri başarılı şekilde değerlendirilmiştir. |

KAYNAKLAR

- [1] L. M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, J. L. F. C. Lima, J. M. Estela, and V. Cerdà, “Automatic in vitro determination of hypochlorous acid scavenging capacity exploiting multisyringe flow injection analysis and chemiluminescence,” *Anal. Chem.*, 2007, doi: 10.1021/ac0700068.
- [2] C. Bergamini, S. Gambetti, A. Dondi, and C. Cervellati, “Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 10, no. 14, pp. 1611–1626, 2005, doi: 10.2174/1381612043384664.
- [3] G. Cao, H. M. Alessio, and R. G. Cutler, “Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 303–311, 1993, doi: 10.1016/0891-5849(93)90027-R.
- [4] G. Cao, C. P. Verdon, A. H. B. Wu, H. Wang, and R. L. Prior, “Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II,” *Clin. Chem.*, 1995, doi: 10.1093/clinchem/41.12.1738.
- [5] K. Güçlü, G. Kibrislioglu, M. Özyürek, and R. Apak, “Development of a fluorescent probe for measurement of peroxy radical scavenging activity in biological samples,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 8, pp. 1839–1845, 2014, doi: 10.1021/jf405464v.
- [6] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., 2015.
- [7] G. Aragay, F. Pino, and A. Merkoçi, “Nanomaterials for sensing and destroying pesticides,” *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 10, pp. 5317–5338, 2012, doi: 10.1021/cr300020c.
- [8] Y. C. Yeh, B. Czeran, and V. M. Rotello, “Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology,” *Nanoscale*. 2012, doi: 10.1039/c1nr11188d.
- [9] S. E. Çelik, B. Bekdeşer, and R. Apak, “A novel colorimetric sensor for measuring hydroperoxide content and peroxy radical scavenging activity using starch-stabilized gold nanoparticles,” *Talanta*, vol. 196, pp. 32–38, May 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2018.12.022.
- [10] X. Zhang, F. G. Wu, P. Liu, N. Gu, and Z. Chen, “Enhanced fluorescence of gold nanoclusters composed of HAuCl₄ and histidine by glutathione: Glutathione detection and selective cancer cell imaging,” *Small*, vol. 10, no. 24, pp. 5170–5177, 2014, doi: 10.1002/sml.201401658.
- [11] D. Min and J. Boff, “Lipid Oxidation of Edible Oil,” 2002.
- [12] L. M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. F. C. Lima, “Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 613, no. 1, pp. 1–19, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047.
- [13] I. Maitra, L. Marcocci, M. T. Droy-Lefaix, and L. Packer, “Peroxy radical scavenging

- activity of Ginkgo biloba extract EGb 761,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 49, no. 11, pp. 1649–1655, May 1995, doi: 10.1016/0006-2952(95)00089-I.
- [14] K. K. Adom and H. L. Rui, “Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 17, pp. 6572–6580, 2005, doi: 10.1021/jf048318o.
- [15] E. Niki, “Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals,” *Methods Enzymol.*, vol. 186, no. C, pp. 100–108, Jan. 1990, doi: 10.1016/0076-6879(90)86095-D.
- [16] G. Cao and R. L. Prior, “Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples,” *Methods Enzymol.*, 1999, doi: 10.1016/S0076-6879(99)99008-0.
- [17] J. Werber, Y. J. Wang, M. Milligan, X. Li, and J. A. Ji, “Analysis of 2,2’-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions,” *J. Pharm. Sci.*, 2011, doi: 10.1002/jps.22578.
- [18] S. B. Nimse and D. Pal, “Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms,” *RSC Adv.*, 2015, doi: 10.1039/c4ra13315c.
- [19] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, 2005, doi: 10.1021/jf030723c.
- [20] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, “Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease,” *Biochemical Journal*. 1984, doi: 10.1042/bj2190001.
- [21] W. Jessup, R. T. Dean, and J. M. Gebicki, “Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins,” *Methods Enzymol.*, vol. 233, no. C, pp. 289–303, 1994, doi: 10.1016/S0076-6879(94)33032-8.
- [22] Z. Y. Jiang, A. C. S. Woollard, and S. P. Wolff, “Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method,” *Lipids*, vol. 26, no. 10, pp. 853–856, 1991, doi: 10.1007/BF02536169.
- [23] B. H. J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Editio. Oxford, UK: Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [24] B. Halliwell and M. Whiteman, “Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 142, no. 2, pp. 231–255, 2004, doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.
- [25] H. KIKUZAKI and N. NAKATANI, “Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents,” *J. Food Sci.*, vol. 58, no. 6, pp. 1407–1410, 1993, doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x.
- [26] C. A. Gay and J. M. Gebicki, “Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay,” *Anal. Biochem.*, vol. 304, no. 1, pp. 42–46,

May 2002, doi: 10.1006/abio.2001.5566.

- [27] K. Grntzalis, D. Zisimopoulos, T. Grune, D. Weber, and C. D. Georgiou, "Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 59, pp. 27–35, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.038.
- [28] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine," *Acc. Chem. Res.*, 2008, doi: 10.1021/ar7002804.
- [29] M. Laura Soriano, M. Zougagh, M. Valcárcel, and Á. Ríos, "Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading," *Talanta*, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2017.09.012.
- [30] O. V. Salata, "Applications of nanoparticles in biology and medicine," *Journal of Nanobiotechnology*. 2004, doi: 10.1186/1477-3155-2-3.
- [31] B. Yang, Y. Chen, and J. Shi, "Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 8, pp. 4881–4985, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00626.
- [32] H. Heinz *et al.*, "Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications," *Surf. Sci. Rep.*, vol. 72, no. 1, pp. 1–58, 2017, doi: 10.1016/j.surfrep.2017.02.001.
- [33] L. Shang, S. Dong, and G. U. Nienhaus, "Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications," *Nano Today*, vol. 6, no. 4, pp. 401–418, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.nantod.2011.06.004.
- [34] A. A. Dayem *et al.*, "The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–21, 2017, doi: 10.3390/ijms18010120.
- [35] S. Guo and E. Wang, "Noble metal nanomaterials: Controllable synthesis and application in fuel cells and analytical sensors," *Nano Today*. 2011, doi: 10.1016/j.nantod.2011.04.007.
- [36] M. J. Ruedas-Rama, J. D. Walters, A. Orte, and E. A. H. Hall, "Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review," *Analytica Chimica Acta*. 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.09.025.
- [37] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discussions of the Faraday Society*. 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.
- [38] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, doi: 10.1039/C39940000801.
- [39] Y. Zhang *et al.*, "Probing histidine-stabilized gold nanoclusters product by high-

- performance liquid chromatography and mass spectrometry,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, no. 36, pp. 18697–18708, 2013, doi: 10.1021/jp405013m.
- [40] T. Laaksonen, V. Ruiz, P. Liljeroth, and B. M. Quinn, “Quantised charging of monolayer-protected nanoparticles,” *Chem. Soc. Rev.*, 2008, doi: 10.1039/b713681c.
- [41] Q. Zhang, J. Xie, Y. Yu, and J. Y. Lee, “Monodispersity control in the synthesis of monometallic and bimetallic quasi-spherical gold and silver nanoparticles,” *Nanoscale*, 2010, doi: 10.1039/c0nr00155d.
- [42] J. Zheng, P. R. Nicovich, and R. M. Dickson, “Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2007, doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104546.
- [43] R. Jin *et al.*, “Size focusing: A methodology for synthesizing atomically precise gold nanoclusters,” *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, doi: 10.1021/jz100944k.
- [44] X. Yuan *et al.*, “Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 11, pp. 8800–8808, 2011, doi: 10.1021/nn202860s.
- [45] I. Díez and R. H. A. Ras, “Few-Atom Silver Clusters as Fluorescent Reporters,” 2010.
- [46] I. Díez and R. H. A. Ras, “Fluorescent silver nanoclusters,” *Nanoscale*. 2011, doi: 10.1039/c1nr00006c.
- [47] L. Zhang and E. Wang, “Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging,” *Nano Today*. 2014, doi: 10.1016/j.nantod.2014.02.010.
- [48] F. Liu, T. Bing, D. Shangguan, M. Zhao, and N. Shao, “Ratiometric Fluorescent Biosensing of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical in Living Cells with Lysozyme-Silver Nanoclusters: Lysozyme as Stabilizing Ligand and Fluorescence Signal Unit,” *Anal. Chem.*, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02995.
- [49] Z. Wu and R. Jin, “On the ligand’s role in the fluorescence of gold nanoclusters,” *Nano Lett.*, 2010, doi: 10.1021/nl101225f.
- [50] J. Xie, Y. Zheng, and J. Y. Ying, “Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters,” *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, doi: 10.1021/ja806804u.
- [51] Y. Xu, J. Sherwood, Y. Qin, D. Crowley, M. Bonizzoni, and Y. Bao, “The role of protein characteristics in the formation and fluorescence of Au nanoclusters,” *Nanoscale*, 2014, doi: 10.1039/c3nr06040c.
- [52] H. Zhang *et al.*, “Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples,” *Anal. Chim. Acta*, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2013.01.042.
- [53] T. Chen, Y. Hu, Y. Cen, X. Chu, and Y. Lu, “A dual-emission fluorescent nanocomplex of gold-cluster-decorated silica particles for live cell imaging of highly reactive oxygen

- species,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 31, pp. 11595–11602, 2013, doi: 10.1021/ja4035939.
- [54] X. Yang, M. Shi, R. Zhou, X. Chen, and H. Chen, “Blending of H₂AuCl₄ and histidine in aqueous solution: A simple approach to the Au₁₀ cluster,” *Nanoscale*, 2011, doi: 10.1039/c1nr10287g.
- [55] A. M. Wade and H. N. Tucker, “Antioxidant characteristics of L-histidine,” *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1998, doi: 10.1016/S0955-2863(98)00022-9.
- [56] Y. Bai, Y. Zhou, H. Liu, L. Fang, J. Liang, and S. Xiao, “Glutathione-Stabilized Fluorescent Gold Nanoclusters Vary in Their Influences on the Proliferation of Pseudorabies Virus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus,” *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 1, no. 2, pp. 969–976, 2018, doi: 10.1021/acsanm.7b00386.
- [57] R. D. Corpuz, Y. Ishida, M. T. Nguyen, and T. Yonezawa, “Synthesis of Positively Charged Photoluminescent Bimetallic Au-Ag Nanoclusters by Double-Target Sputtering Method on a Biocompatible Polymer Matrix,” *Langmuir*, 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b02011.
- [58] M. A. Habeeb Muhammed, S. Ramesh, S. S. Sinha, S. K. Pal, and T. Pradeep, “Two distinct fluorescent quantum clusters of gold starting from metallic nanoparticles by pH-dependent ligand etching,” *Nano Res.*, 2008, doi: 10.1007/s12274-008-8035-2.
- [59] M. Laguerre, J. Lecomte, and P. Villeneuve, “Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 244–282, 2007, doi: 10.1016/j.plipres.2007.05.002.
- [60] H. Yin, L. Xu, and N. A. Porter, “Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis,” *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 10, pp. 5944–5972, Aug. 2011, doi: 10.1021/cr200084z.
- [61] A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. F. C. Lima, “Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species,” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
- [62] P. F. Assay, “of variation for 5 replicate samples . The linear relation is obtained between the corrected peak heights and the concentrations of added PC- HPO is in the range of 0-60 pmol / 500 / μ l plasma . The 15 plasma samples gave 20-55 pmol / ml of PC-HPO . Rec,” *Methods*, vol. 186, no. 1989, pp. 161–168, 1990.
- [63] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, and S. E. Karademir, “Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 26, pp. 7970–7981, 2004, doi: 10.1021/jf048741x.
- [64] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior, “Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe,” *J. Agric. Food Chem.*, 2001, doi: 10.1021/jf010586o.

- [65] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, and K. Güçlü, "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 85, no. 5, pp. 957–998, 2013, doi: 10.1351/PAC-REP-12-07-15.
- [66] E. Dorta *et al.*, "The ORAC (oxygen radical absorbance capacity) index does not reflect the capacity of antioxidants to trap peroxy radicals," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 50, pp. 39899–39902, 2015, doi: 10.1039/c5ra01645b.
- [67] D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, and E. K. Deemer, "Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 7, pp. 1815–1821, 2002, doi: 10.1021/jf0113732.
- [68] Y. Zhong and F. Shahidi, "12 - Methods for the assessment of antioxidant activity in foods | This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods.," in *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, F. Shahidi, Ed. Woodhead Publishing, 2015, pp. 287–333.
- [69] D. D. M. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, and S. Locke, "Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins," *FEBS Lett.*, 1985, doi: 10.1016/0014-5793(85)81208-4.
- [70] P. D. MacLean, E. C. Drake, L. Ross, and C. Barclay, "Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma," *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.020.
- [71] K. Y.H. *et al.*, "Total peroxy radical-trapping ability and anti-oxidant vitamins of the umbilical venous plasma and the placenta in pre-eclampsia," *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2006.
- [72] R. L. Prior and G. Cao, "In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods," in *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(99)00203-8.
- [73] M. Valkonen and T. Kuusi, "Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum," *J. Lipid Res.*, 1997.
- [74] X. Chen, Z. Zhong, Z. Xu, L. Chen, and Y. Wang, "2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy," *Free Radic. Res.*, vol. 44, no. 6, pp. 587–604, 2010, doi: 10.3109/10715761003709802.
- [75] Y. Yilmaz and R. T. Toledo, "Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 1, pp. 41–48, 2006, doi: 10.1016/j.jfca.2004.10.009.
- [76] S. Zhang, J. Chen, Q. Zhao, Q. Xie, and X. Wei, "Chemosphere Unveiling self-sensitized

- photodegradation pathways by DFT calculations : A case of sunscreen p -aminobenzoic acid,” *Chemosphere*, vol. 163, pp. 227–233, 2016, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.028.
- [77] W. Bors, C. Michel, and M. Saran, “Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.*, vol. 796, no. 3, pp. 312–319, Dec. 1984, doi: 10.1016/0005-2760(84)90132-2.
- [78] A. Zulueta, M. J. Esteve, and A. Frígola, “ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products,” *Food Chem.*, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.033.
- [79] J. D. Lambert and R. J. Elias, “The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010, doi: 10.1016/j.abb.2010.06.013.
- [80] J. S. Wright, E. R. Johnson, and G. A. DiLabio, “Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants,” *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, doi: 10.1021/ja002455u.
- [81] G. Kamer, B. Demirata, R. Bayraktar, D. Ozyurt, and R. Apak, “Nanoceria-based reactive species scavenging activity of antioxidants using N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) probe,” *Anal. Methods*, 2019, doi: 10.1039/c8ay02561d.

EKLER

|



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Herbert Cirrus KABOGGZA
Doğum Yeri	KAMPALA
Doğum Tarihi	02.10.1994
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer: UGANDA
Telefon	+ 90 538 562 22 58
E-Posta Adresi	Herbertcirrus50@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite	MAKERERE ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	NATURAL SCIENCES
Bölümü	INDUSTRIAL CHEMISTRY
Mezuniyet Yılı	2016

Yüksek Lisans

Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	ANALİTİK KİMYA

Makale ve Bildiriler