

**BAZI FENOLİK ASİTLER VE
KOMBİNASYONLARININ
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nurcan BEKTAŞ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı
Şubat-2005**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurcan BEKTAŞ' ın "BAZI FENOLİK ASİTLER VE KOMBİNASYONLARININ ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans tezi 07.02.2005 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Üye : Prof.Dr. Nuray ARI

Üye : Yrd.Doç.Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 24.01.2004 tarih ve 03/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI FENOLİK ASİTLER VE KOMBİNASYONLARININ
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nurcan BEKTAŞ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

2005

Serbest radikaller eşleşmemiş elektron taşıyan kararsız iyon veya moleküllerdir. Antioksidanlar ise serbest radikallerin olumsuz etkilerini önleyen veya ortadan kaldıran maddelerdir. Bitkilerin rengi, kokusu ve tadından sorumlu fenolik asitler ise önemli antioksidan kaynaklarıdır. Tez kapsamında, bazı hidroksibenzoik asit (gallik, protokateşik, vanilik, *p*-hidroksibenzoik ve salisilik asitler) ile hidroksisinnamik asitlerin (ferulik, *tr*-sinnamik, kafeik, *p*-kumarik, *o*-kumarik asitler) ve bunların kombinasyonlarının antioksidatif (Ransimat ve β -karoten-linoleik asit sistemi ile) ve antiradikal aktiviteleri (DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini) sentetik antioksidanlar BHT ve BHA' ninkiler ile karşılaştırılmıştır.

Ransimat yönteminde zeytin yağına ilave edilen fenolik asitlerden GA, KAA, proKA ve FA' in lipid oksidasyonunun indüklenme zamanını oldukça arttırdıkları görülmüştür. DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkileri, test edilen fenolik asitlerin GA = proKA > KAA, kombinasyonlarının ise GA+proKA > GA+VA > GA+*p*OHBA > GA+SAA > FA+KAA > pKUA+KAA şeklinde tesbit edilmiştir. β -karoten-linoleik asit sistemi ile antioksidan aktivite tayininde ise test edilen hiçbir fenolik asit veya kombinasyonunun β -karoten oksidasyonunu BHT veya BHA kadar inhibe edemediği, ancak çok düşük aktivite gösterdikleri tesbit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Serbest radikaller, antioksidanlar, fenolik asitler, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), serbest radikal süpürücü etki, Ransimat yöntemi, β -karoten linoleik asit sistemi

ABSTRACT
M.Sc THESIS

**ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF
SOME PHENOLIC ACIDS AND COMBINATIONS**

Nurcan BEKTAŞ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı**

Supervisor: Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

2005

Free radicals, in general, are labile ions or molecules bearing uncoupled electron pairs. Antioxidants are compounds which are able to diminish or abolish the deterioration due to free radical species. Being a responsible ingredient for the colour, flavour and aroma of various plants, phenolic acids are accepted as an important source for antioxidant compounds.

In this thesis, we compared the antioxidant and free radical scavenging activities of some hydroxybenzoic (gallic, protocatechic, vanillic, *p*-hydroxybenzoic ve salicylic acids) and hydroxycinnamic (*tr*-cinnamic, *p*-coumaric, *o*-coumaric, ferulic and caffeic acids) acids and their combinations with those of BHT and BHA, synthetic antioxidants.

In the Rancimat test, the addition of tested phenolic acids (GA > CAA > proCA > BHA > FA > BHT) in olive oil significantly extended the induction time of lipid oxidation. The potency order for the radical scavenging activities of phenolic acids on DPPH was GA = proCA > CAA > BHA > BHT, and for the combinations was GA+proCA > GA+VA > GA+*p*OHBA > GA+SAA > FA+CAA > BHA > *p*CUA+CAA > BHT

None of the tested phenolic acids and their combinations did not exhibit an inhibition in heat-induced oxidation of β -carotene and linoleic acid system as potent as BHT or BHA. However they had only slight activities in this system.

Keywords: Free radicals, antioxidants, phenolic acids, free radical scavenging activity, Rancimat Method, β -caroten linoleic acid system

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve öneriyle beni yönlendiren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız, sayın hocam Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK' e,

Çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve öneriyle desteğini esirgemeyen ve çalışmamın yönlendirilmesine çok önemli katkılar sağlayan Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam Yrd.Doç.Dr. Nilgün ÖZTÜRK' e,

Değerli eleştiri ve önerileri ile çalışmalarımın katkıda bulunan ve proje imkanlarını benim için seferber eden Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Öğretim üyesi hocam Yrd.Doç.Dr. Berrin BOZAN'a,

Yardımları ile her zaman yanımda olduğu için arkadaşım Arş.Gör. Sinem ILGIN' a,

Yardımları için arkadaşım Öğr.Gör. Ahmet SARAÇOĞLU' na,

Çalışmamızı gerçekleştirmemizde laboratuvar imkanlarını bize sunan AÜBİBAM yönetimine,

Maddi ve manevi destekleri ile yaşamımın tüm aşamalarında yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. Serbest radikallerin oluşumuna neden olan faktörler	4
2.1.1.1. Endojen faktörler	4
2.1.1.2. Serbest radikal oluşumuna neden olan kimyasal ve çevresel faktörler	5
2.1.2. Serbest radikal türleri	5
2.1.2.1. Süperoksit Radikali (O₂⁻)	6
2.1.2.2. Hidrojenperoksit Radikali (H₂O₂)	6
2.1.2.3. Hidroksil radikali(HO[•])	7
2.1.2.4. HOCl (hipoklorik asit)	8
2.1.2.5. Singlet oksijen (O^{↑↓})	8
2.1.2.6. R[•] (Alkil radikali)	8
2.1.2.7. Nitrik Oksit (NO)	9
2.1.2.8. DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	9
2.1.3. Serbest radikallerin biyokimyasal etkileri	10
2.1.3.1. Serbest radikallerin lipidler üzerine etkileri	10
2.1.3.2. Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri	12
2.1.3.3. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri	12
2.1.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine etkileri	13

2.1.4. Serbest radikallere baęlı olarak geliřtięi dūřünūlen hastalıklar	13
2.2. Antioksidanlar	21
2.2.1. Antioksidan etki mekanizmaları	22
2.2.2. Antioksidan çeşitleri	22
2.2.2. 1. Vitamin A ve β-karoten;	23
2.2.2. 2. Vitamini C (askorbik asit)	24
2.2.2. 3. Vitamin E ve tokoferoller	25
2.2.2.4. Süperoksit dismutaz (SOD)	26
2.2.2.5. Katalaz	26
2.2.2.6. Glutasyon (GSH)	27
2.2.2.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	28
2.2.2.8. Glutasyon Redüktaz (GR)	28
2.2.2.9. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	29
2.2.2.10. Melatonin	29
2.2.2.11. Ürik asit	30
2.2.2.12. Albümin	30
2.2.2.13. Bilirübin	31
2.2.2.14. Seruloplazmin	31
2.2.2.15. Ferritin	31
2.2.2.16. Transferin ve Laktoferrin	31
2.2.2.17. Haptogloblin ve Hemopeksin	31
2.2.2.18. Probukol	31
2.2.2.19. Deferoksamin (DFO)	32
2.2.2.20. Lipoik Asit	32
2.2.2.21. Polifenolik bileşikler	32
i) Flavonoidler	32
ii) Fenolik asitler	34
a) <i>Hidroksibenzoik asit Türevleri</i>	36
I) Gallik asit	36
II) Protokateşik asit	37

III) Salisilik asit	37
IV) Vanillik asit	38
V) <i>p</i> -hidroksibenzoik asit	38
<i>b) Hidroksisinnamik asit Türevleri</i>	38
I) Kafeik asit	38
II) Ferulik asit	39
III) <i>p</i> - ve <i>o</i> -Kumarik asit	39
IV) <i>tr</i> -sinnamik asit	40
2.2.2.22. Sentetik antioksidanlar	40
i) BHT	40
ii) BHA	41
iii) Gallatlar	42
iv) TBHQ	42
2.2.2. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri	42
2.2.2.1. Lipid peroksidasyonu inhibisyonuna dayalı yöntemler	42
i) Peroksit sayısı	42
ii) Schaal fırın testi	42
iii) Tiyobarbütirik asit testi (TBARS)	43
iv) β -karoten-linoleik asit sistemi	43
v) Ransimat yöntemi	43
2.2.2.2. Serbest radikal süpürücü etki tayin yöntemleri	44
i) DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü Etki	44
ii) TRAP (total radikal-trapping parameter)	44
iii) Total Antioksidan Kapasite (TEAC) Ölçümü	44
iv) Süperoksit anyon süpürücü aktivite testi (FRAP)	45
v) Elektron Paramagnetik Rezonans Spektroskopisi (EPR)	45
3. MATERYAL ve YÖNTEM	46
3.1. Materyal	46
3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve çözeltiler	46
3.1.2. Kullanılan cihazlar	46
3.1.3. Kullanılan malzemeler	46

3.2. Yöntem	46
3.2.1. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	46
3.2.2. β-karoten-linoleik Asit Sistemi Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini	47
3.2.3. Ransimat yöntemi ile Lipid oksidasyonunu inhibe edici etki	48
4. BULGULAR	49
4.1. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini Sonuçları	49
4.2. β-karoten-linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları	53
4.3. Ransimat yöntemi ile Lipid oksidasyonunu inhibe edici etki Sonuçları	57
5. TARTIŞMA	59
6. KAYNAKLAR	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1. Fenolik asitlerin 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri	52
2. Hidroksibenzoik asit türevlerinin kombinasyonlarının 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri	52
3. Hidroksisinnamik asit türevlerinin kombinasyonlarının 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri	53
4. β -karoten-linoleik asit sisteminde fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri	55
5. β -karoten-linoleik asit sisteminde hidroksibenzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri	56
6. β -karoten-linoleik asit sisteminde hidroksisinnamik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri	56
7. Ransimat yöntemi ile zeytin yağının peroksidasyonu üzerine fenolik asitlerin etkisi	58

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1. Fenolik asitler ve kombinasyonlarının 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri	50
2. Fenolik asit ve kombinasyonlarının β -karoten-linoleik asit sisteminde % Antioksidan Aktivite değerleri	54
3. İki farklı konsantrasyonda zaytin yağına ilave edilen fenolik asitlerin Ransimat yöntemi ile ölçülen bozunma indisleri	58
4. Gallik ve Kafeik asit kombinasyonlarının antiradikal ve antioksidan aktiviteleri	62

1. GİRİŞ

Biyolojik olarak oksijenin yaşam için vazgeçilmez olduğu bir gerçektir. Ancak oksijenin etkisi gerçekte iki yönlüdür. Canlı organizmadaki bazı aktif oksijen türlerinin varlığının 50'den fazla hastalığa yol açtığı bilinmektedir (Shahidi ve Naczki, 1995; Namiki, 1990). Özellikle son yıllarda gerçekleşen biyomedikal araştırmalar reaktif oksijen türlerinin (ROT) doku üzerindeki hasarları, etki mekanizması ve vücut savunma sistemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu türlerin günümüzde yol açtığı bilinen fizyopatolojik durumların başında kanser, şeker hastalığı, karaciğer yetmezliği ve yaşlanma gelmektedir (De-Groot ve Noll, 1986).

Reaktif oksijen türleri canlı organizmasının yapısında bulunan maddelerdir ve bunlar sağlıklı dokuda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler yardımıyla yok edilebilirler. Ancak çevresel faktörler, UV ışınları, toksinler, metal varlığı, sigara ve stres gibi dış etkilerin varlığı ile organizmada bulunan bu oksijen türleri enzimlerle tolere edilemeyecek oranda bulunurlar. Bu da organizmanın lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi diğer bileşenleri ile reaksiyona girerek yapılarının bozulmasına ve doku hasarına neden olurlar (Rice-Evans ve ark, 1991).

Antioksidan ve serbest radikal süpürücü etki günümüzde biyomedikal alanın güncel ve çok geniş kapsamlı bir araştırma konusudur. Konunun bir boyutu besinlerin uygun katkı maddeleri ile korunmasını ilgilendirirken, diğer bir boyutu da çeşitli hastalıklarla ortaya çıkan oksidatif hücre hasarlarını ve bunların önlenme yollarını araştırma konusu olarak ele alınmaktadır (Summan ve ark.,1997). Ayrıca, bu geniş kapsamlı konunun kozmetikte çeşitli uygulamaları yer almaktadır. Lipid oksidasyonu, besinlerin kalitesini kaybetmesinin diğer bir deyişle renk, koku, tad, görünüş ve besin değeri gibi önemli özelliklerinin kaybolmasının nedenidir (Shahidi ve Wanasundara, 1992). Antioksidanlar ise radyasyon, çevre kirliliği gibi dolaylı bir takım olaylardan etkilenen canlı metabolizmada kendiliğinden oluşan serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önleme yeteneğine sahiptirler. Gıda endüstrisinde oksidatif bozunmadan

korumak için rutin olarak BHA (butillenmiş hidroksianizol), BHT (butillenmiş hidroksitoluol) PG (propilgallat)ve TBHQ (tersiyer-butilhidrokinon) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanlar oldukça etkin, stabil ve ucuz olmalarına karşın, yan etkileri konusunda çeşitli tartışmalar vardır (Harborne, 1994). Bu nedenle, son yıllarda antioksidan aktivite ile ilgili çalışmaların çoğunluğu doğal antioksidanlarla ilgilidir.

Pekçok tayin yönteminde, tokoferoller, flavonoidler, kumarinler, antosiyaninler, fenolik asitler gibi bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan pekçok polifenolik bileşik antioksidan aktivite göstermektedirler. Potansiyel bir kaynak olarak bitkisel fenoller primer antioksidan aktiviteye sahiptirler (Shahidi ve Naczki, 1995).

Bitkiler aleminin pekçok üyesinin kimyasal yapısında bulunan fenolik asitler aynı zamanda antioksidan aktiviteden sorumlu bileşiklerdir. Yapılarında bulunan hidroksil ve metoksi gruplarının sayısı ve konumuna göre benzoik ve sinnamik asit türevleri olmak üzere basitçe iki sınıfa ayrılmışlardır. Aynı zamanda bu hidroksil ve metoksi grupları fenolik asitlerin biyolojik aktivitelerini de belirlemektedir (Cadenas ve Packer,2002).

Tez kapsamında 5 benzoik asit türevi (*p*-OH-Benzoik asit (*p*OHBA), gallik asit (GA), salisilik asit (SA), vanilik asit (VA), protokateşik asit (proKA)) ve 5 sinnamik asit türevi (*tr*-sinnamik asit (*tr*SLA), ferulik asit (FA), kafeik asit (KAA), *p*-kumarik asit (*p*KUA), *o*-kumarik asit (*o*KUA)) ve bunların bitkilerde bir arada bulunduğu düşünülerek (sinerjik etkili) ikili kombinasyonlarının Ransimat yöntemi ve β -karoten- linoleik asit sisteminde antioksidan aktiviteleri ve DPPH radikali üzerinden serbest radikal süpürücü etkileri araştırılmış ve bu etkileri en yaygın sentetik antioksidanlar BHT ve BHA'ninkiler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Serbest Radikaller

Genel bir tanımlamaya göre serbest radikaller, eşleşmemiş elektron taşıyan iyon veya moleküllerdir (Larson, 1997; Anonim, 2005f; Cadenas ve Packer, 2002). Bilindiği gibi atomun yapısı, bir çekirdek, nötron, proton ve elektronlardan oluşmaktadır. Atom çekirdeğindeki pozitif yüklü protonlar atomun etrafındaki negatif yüklü elektronların sayısını belirlemektedir. Elektronlar kimyasal reaksiyonlara girerek, atomların birbirine bağlanmasını ve yeni moleküllerin oluşmasını sağlamaktadır (Yurdakul, 2005).

Bir atomun kimyasal davranışını belirleyen en önemli kriter dış orbitallerindeki elektron sayısıdır (Anonim, 2005g). Kararlı moleküllerin en dış orbitallerinde zıt yönde dönen eşleşmiş iki elektron bulunmaktadır. Bu orbitaller kovalent bağ oluşumunu sağlarlar. Bunların dışında bir elektronu eşleşmemiş veya en dış orbitalinde tek bir elektron içeren moleküller kararsız yapıdadırlar (Rice-Evans ve ark., 1991).

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağ oluşturmaktadır. Bağ koştuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atomda) ya da ayrılırlar (birisi bir atomda, diğeri diğeri atomda). Aynı atomda kalırlarsa oluşan yapı bir iyon, ayrılırlarsa oluşan yapı serbest radikaldir (Gümrükçüoğlu, 2005).

Serbest radikaller, dış orbitallerinde taşıdıkları eşleşmemiş elektrondan dolayı kararsız yapıdadırlar ve oldukça reaktiflerdir. Elektron bakımından dengeli olmayan bu serbest radikaller, yeniden kararlı duruma gelmeye çalışırken vücut dokularına zarar vermektedirler (Anonim, 2005a; 2005h; 2005g; Sherman, 1998). Serbest radikaller kararlı hale geçmek için, yağ asitleri, proteinler ve DNA gibi önemli biyolojik moleküllerden hidrojen atomu kaptıkları zaman, hidrojen kaybeden molekülün kendisi, serbest radikal haline geldiği ve bu da komşu moleküllerden hidrojen atomlarını kaptığı için bir zincirleme reaksiyona yol açmaktadır (Anonim, 2005a; 2005h; Bagchi ve Puri, 1998).

2.1.1. Serbest radikallerin oluşumuna neden olan faktörler

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, insan vücudunda hem normal metabolik süreçlerde hem de çevredeki çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli olarak üretilmektedirler (Yurdakul, 2005; Sherman, 1998; Anonim, 2005h; Cadenas ve Packer, 2002).

2.1.1.1. Endojen faktörler

Mitokondrial elektron transport zinciri, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması, fagositik hücrelerde (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) meydana gelen oksidatif reaksiyonlar, sitokrom P450 enzim sistemleri, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler, iskemi/reperfüzyon süreci, inflamasyon ve bilinçsiz yapılan eksersizlerde rol oynayan endojen süreçlerdir (Frei, 1994, Bagchi ve Puri, 1998, Anonim, 2005e; Kayaalp, 2000).

Yüksek yapıları canlı organizmaların tümü yaşamlarını sürdürmek için oksijene gereksinim duymaktadır. Oksijen, mitokondriyal solunum zincirinde ATP üretimi sırasında terminal elektron kabul edicidir (Melov, 2002). Mitokondride ATP sentezi sırasında oksijen kullanıldığından, ROT (reaktif oksijen türleri) oluşumu bu süreçte kaçınılmazdır (Poston ve Raijmakers, 2004; Sorg, 2004). Mitokondrial oksidatif fosforilasyon sonucunda ana metabolit olarak karbondioksit oluşurken yaklaşık %3-5 oranında da ROT meydana gelmektedir (Urso ve Clarkson, 2003; McDonough, 2003).

Hücrelerde serbest radikal oluşumu enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlar sonucunda meydana gelmektedir. Sitokrom P450 enzim sistemi, prostaglandin sentezi ve fagositoz süreçleri serbest radikal oluşumuna neden olan enzimatik reaksiyonlardır. Ayrıca serbest radikaller, radyasyon tarafından indüklenen, organik bileşiklerle oksijen arasındaki non-enzimatik reaksiyonlar sonucunda da oluşabilmektedirler (Frei, 1994).

Ayrıca serbest radikaller bazı hücreler tarafından savunma amaçlı olarak da üretilmektedirler. Makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositik hücreler, patojenler ile karşılaştıkları zaman serbest radikalleri meydana getirmektedirler (Scheibmeir ve ark., 2004). Fagositik hücreler nitrik oksit, süperoksit, hipoklorit ve hidrojen peroksit' in oksidatif olarak yanması sonucu bakterileri veya virüs bulaşmış

hücrelerin yıkımına neden olmaktadır. Ancak, parazitler, bakteriler veya virüslerle oluşan kronik enfeksiyonlar, kronik fagositik aktiviteye ve bunun sonucunda kronik inflamasyona neden olduğundan, kanser gelişim riskini arttırmaktadırlar (Frei, 1994).

2.1.1.2. Kimyasal ve çevresel faktörler

Toksinler; karbondioksit, benzen, toluen, benzo(a)pirin (Valcheva-Kuzmanova ve ark., 2004; Senator ve ark., 2004), ilaçlar; adriamisin, bleomisin, mitomisin C, klorpromazin ve nitrofurantoin (Yıldırım ve ark., 2004; Sherman, 1998; Bagchi ve Puri; 1998), hava kirliliği; primer olarak; karbonmonoksit, nitrik oksit, aldehitler ve alkil nitratlar (Bernstein, 2004), radyasyon ve güneş ışığı (Yu ve Zhou, 2005), sekonder olarak; alkol, sigara ve barbekü dumanı, peroksit olmuş yağlar (et veya peynirde) ve dondurulmuş gıdalardır (Munnia ve ark., 2004; Rodriguez-Estrada ve ark., 1997).

2.1.2. Serbest radikal türleri

Reaktif oksijen türleri (ROT) terimi, kolayca radikallere dönüşen oksijen bileşikler, oksidan özelliği olan non-radikal bileşikler ve bütün oksijen radikalleri için kullanılan ortak bir terimdir. Aynı şekilde; radikal olan veya olmayan azot türevi okside edici ajanlara da reaktif azot türleri denir (Cadenas ve Packer, 2002)

i) Radikaller;

*Reaktif oksijen türleri (ROT) ; Süperoksit (O_2^-), Hidroksil (OH^\cdot), Lipid peroksil (LO_2^\cdot), Lipid alkoksil (LO^\cdot)

*Reaktif klor türleri; Atomik klor (Cl^\cdot)

*Reaktif azot türleri; Nitrik oksit (NO), Azot dioksit (NO_2)

ii) Non-Radikaller;

* Reaktif oksijen türleri; Hidrojen peroksit (H_2O_2), Singlet oksijen (O^1), Lipid peroksitler (LOOH)

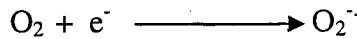
*Reaktif klor türleri; Hipoklorik asid (HOCl)

*Reaktif azot türleri; Nitröz asid (HNO₂), Peroksinitrit (ONOO⁻), Peroksinitrik asid (ONOOH), Alkil peroksinitritler (ROONO) (Anonim, 2005e).

Biyolojik sistemlerdeki primer radikaller, süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri ve nitrik oksit radikalleridir. Diğerleri ise sekonder radikaller olarak bilinmektedir (Anonim, 2005f)

2.1.2.1. Süperoksit radikali (O₂⁻)

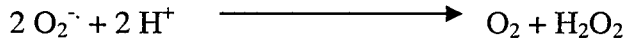
Süperoksit radikali, canlılarda oluştuğu bilinen ilk radikaldır. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken, süperoksit radikali oluştururlar. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca aktive olmuş fagositik lökositler bol miktarda süperoksit radikali üreterek fagozom içine ve buldukları ortama salarlar. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal üretimi, hidrojen peroksit veya peroksinitritler gibi daha başka reaktif türlerin oluşumuna da katkıda bulunmaktadır (Melov, 2002; Poston ve Raijmakers, 2004; Brown ve Yamamoto, 2003; Du ve Gebicki, 2004). Süperoksit radikali, çeşitli enzimler tarafından da oluşturulur. Ksantin oksidaz enzimi süperoksit radikali üretiminde en etkili enzim olarak bilinmektedir (Poston ve Raijmakers, 2004). Ayrıca demir gibi metal geçiş iyonlarının hava ile direkt oksidasyonu sırasında da süperoksit radikali oluşmaktadır. Bu süreçte, oksijen iyonla kompleks oluşturmakta ve elektron transferi meydana gelmektedir. Oksijen metabolizmasında görev alan hemoglobin gibi demir kompleksleri bulunan hücrelerde bu yolak oldukça önemlidir (Larson, 1997).



2.1.2.2. Hidrojenperoksit radikali (H₂O₂)

Süperoksit radikaline bir elektron eklenmesi (süperoksit dismutasyonu) sonucunda hidrojenperoksit oluşmaktadır. Dismutasyon, spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile gerçekleşmektedir (Scheibmeir ve ark., 2004). Ayrıca, nötrofillerde de inflamasyona yanıt olarak hidrojenperoksit

radikali üretilmektedir (Duggan ve ark., 2002). Hidrojenperoksit radikali, yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz ve reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak değerlendirilmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında, hidroksil radikalının prekürsörü olarak davranmasıdır (Sorg, 2004; Larson, 1997; Rauen ve ark., 2004). H_2O_2 ' in çoğunluğu selüler katalaz enzimi aracılığı ile oksijen ve suya ayrışır. Katalaza ilaveten glutatyon peroksidaz enzimi de bu ayrışmayı sağlamaktadır (Scheibmeir ve ark., 2004). Ayrıca, H_2O_2 , lipid peroksitlerin oluşumunu ve tiyollerin oksidasyonunu sağlamaktadır (Sorg, 2004).

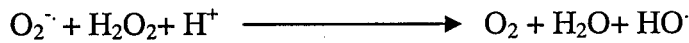


2.1.2.3. Hidroksil radikali(HO^\cdot)

1. Fenton Reaksiyonu; Hidrojen peroksit, Fe^{+2} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek hidroksil radikalini oluşturmaktadır (Anonim, 2005e; Okai ve ark., 2004; Kayaalp, 2000).



2. Haber-Weiss reaksiyonu; Hidrojen peroksit, süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Bu reaksiyon bakır ve demir tarafından kataliz edilmektedir (Qian ve Buettner, 1999; Kayaalp, 2000).



3. Suyun yüksek enerjili radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşmaktadır (Anonim, 2005e; Takeshita ve ark., 2004).
4. Hidrojen peroksitin UV ışığına maruz kalması ile de hidroksil radikali oluşmaktadır (Anonim, 2005e).

Hidroksil radikali C-H bağına etki ettiği zaman karbon merkezli serbest radikaller (R_3C^\cdot) oluştuğu görülmektedir. Oluşan bu serbest radikaller, moleküler

oksijen ile reaksiyona girerek hızlı bir şekilde aktive olur ve reaksiyon ürünü olarak peroksil radikaller (ROO[·]) oluşmaktadır (Larson, 1997).

2.1.2.4. HOCl (Hipoklorik asit)

Hidroksil radikalleri klor ile reaksiyona girerek dokuda sitotoksik madde olan hipoklorik asitin oluşumunu sağlar (Kayaalp, 2000). HOCl radikal olmamasına karşın reaktif oksijen türleri arasında yer almaktadır. Amino ve sülfür içeren grupların oksidasyonunda (Sorg, 2004) ve fagositik hücrelerde bakterilerin yokedilmesinde önemli rol oynamaktadır (Zavodnik ve ark., 2004).

2.1.2.5. Singlet oksijen (O^{1Δ})

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmamasına rağmen, reaktif oksijen türleri arasında yer alan singlet oksijen, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduğundan önem taşımaktadır (Anonim, 2005e). Pigmentlerin (flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin gibi) oksijenli ortamda ışığı absorbe etmesi sonucunda, metallerin varlığında hidroperoksitlerin yıkım tepkimelerinde, kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında ve sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi sırasında singlet oksijen oluşmaktadır (Yurdakul, 2005). Ayrıca, miyeloperoksidaz ve eozinofil peroksidazın katalize ettiği reaksiyonlar sırasında ve nötrofil, eozinofil ve makrofajların aktivasyonu sonucu da oluşmaktadır. UV ışınlarına maruz kalmak da singlet oksijen oluşumuna neden olmaktadır.

O^{1Δ} başta proteinler olmak üzere DNA, kolestrol, lipid ve aminoasit gibi biyomoleküllerle etkileşmektedir (Sorg, 2004).

2.1.2.6. R[·] (Alkil radikali)

Alkil radikali, yağ asitleri başta olmak üzere, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkararak karbon merkezli organik peroksit radikallerin (RCOO[·]) ve peroksil radikallerinin (ROO[·]) oluşumuna neden olmaktadır (Sorg, 2004). Peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür (Anonim, 2005e).

2.1.2.7. Nitrik Oksit (NO)

Vücutta oksijen türevi radikallerin yanısıra, oksijen türevi olmayan radikaller de oluşmaktadır. Bu grupta en önemli serbest radikal azot merkezli radikal olan nitrik oksit (NO) dir (Anonim, 2005e).

Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif azot türevlerinin en önemlisi oksidasyon değeri +2 olan NO'dur. NO, bir azot atomu ile bir oksijen atomunun çiftleşmemiş elektronlarını vererek birleşmelerinden meydana gelmekte ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjinin'den sentezlenmektedir. NO' in tek başına radikal özelliği, ortaya çıkan toksisiteyi tanımlamaya yetmemektedir. NO' in ortamda bulunan ROT' i ile reaksiyona girerek, örneğin süperoksit radikali ve oksijen varlığında, güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOO⁻) (Sorg, 2004) ve azotoksit oluşturduğu ve bunların da ileri dekompozisyonla HO[•] radikali oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir (Sorg, 2004; Abuja ve Albertini, 2001).

Peroksinitrit, tiyollerin ve aromatik grupların oksidasyonunu sağlamaktadır (Sorg, 2004). Ayrıca, tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro-türevleri (nitrotirozin) oluşumuna neden olmaktadır.

Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonunda ve buna bağlı olarak gelişen ateroskleroz, hipertansiyon gibi bazı önemli vasküler hastalıklarda rol oynamaktadır (Anonim, 2005e).



2.1.2.8. DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

DPPH, kararlı bir radikaldir ve bir elektron veya hidrojen kabul eder. Antioksidanların, DPPH radikale bir hidrojen atomu verme yetenekleri üzerinden süpürücü etki gösterdikleri düşünülmektedir (Frankel ve Meyer, 2001; Frankel ve Meyer, 2000; Gülçin ve ark., 2004). Fenolik bileşiklerin aktivitelerinde etkinin yapı-etki ilişkisinin anlaşılması için kullanılan ilk sentetik radikallerdendir. DPPH radikalının diğer radikallerle (alkiller) etkileşimi kullanımını sınırlandırmaktadır. (Frankel ve Meyer, 2000).

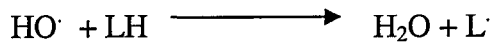
2.1.3. Serbest radikallerin biyokimyasal etkileri

Oldukça yüksek aktiviteye sahip olan serbest radikal türlerinin çoğu, sitoplazmik membranın lipidlerinin peroksidasyonuna ve membran permeabilitesinin artmasına, enzimlerin ve sitostrüktürel proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz-bağlanmasına, enzimlerin inaktivasyonuna, bu arada antiproteazların inhibisyonu sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, DNA yapısının bozulmasına ve kırılmasına neden olmaktadır (Kayaalp, 2000). Hedeflerde oluşacak hasarın şiddeti, hedefteki radikal konsantrasyonuna, hedef ile oksidan arasında gerçekleşen reaksiyonun hız sabitine, oksidanın olduğu bölgeye göre hedefin konumuna, hasara yol açan ikincil olayların oluşumuna (zincirleme reaksiyon ve hasar transfer prosesi), oksidan süpürücü reaksiyonların oluşumuna ve onarım mekanizmalarına bağlıdır (Davies, 2004).

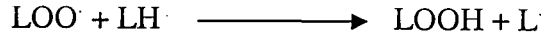
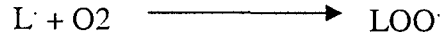
2.1.3.1. Serbest radikallerin lipidler üzerine etkileri

Lipid peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinde meydana gelen zincirleme bir reaksiyondur ve dört aşamada oluşur;

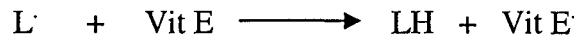
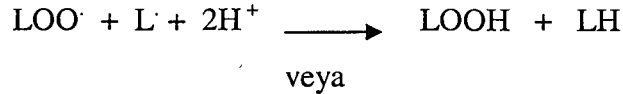
1. Başlama safhası: HO[·] radikali veya herhangi bir reaktif radikal, bir poliansatüre yağ asidinin metilen kısmından bir hidrojen atomu kopartarak, lipid radikali oluşturur. Bu reaksiyon hem membran lipidleri hem de besinler ile alınan yağlar için geçerlidir (Abuja ve Albertini, 2001).



2. İlerleme safhası: Zincirleme reaksiyon, oluşan lipid radikaline O₂ ilavesi ile devam etmekte ve lipid peroksil radikali (LOO[·]) meydana gelmektedir. Lipid peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni radikaller oluşmasına neden olurken, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşmektedirler. Hidroperoksitlerin parçalanması ile lipid alkoksi radikalleri açığa çıkmaktadır (Meram ve Aktaran, 2002; Abuja ve Albertini, 2001).



3. Yıkım Safhası: Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma, lipidin parçalanmasına yol açmaktadır. Bu aşamada oluşan ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA) kan ve idrarda saptanabilmektedir. Ayrıca son ürün olarak etan ve pentan oluştuğu tesbit edilmiştir. Oluşan bu aktif ürünler DNA'ya bağlanarak mutasyonlara neden olmaktadır (Çırak ve ark., 2003).
4. Sonlanma safhası: Sağlıklı sistemlerde bu zincir reaksiyonlar katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan sistemler tarafından bloke edilmektedir (Çırak ve ark., 2003; Meram ve Aktaran, 2002; Abuja ve Albertini, 2001).



Demir ve bakır gibi redoks reaksiyonlarına neden olan metallerin varlığında lipid peroksidasyonu ürünleri artmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksiller, hidroperoksitler ve aldehitler membran yapısına direkt olarak zarar verirken, diğer hücre bileşenlerini ise ürettikleri aldehitler aracılığı ile indirekt olarak etkilemektedirler (Meram ve Aktaran, 2002; Abuja ve Albertini, 2001; Park ve ark., 2002). Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucunda hücrelerin geçirgenliği arttığından, kalsiyumun hücre içine geçişi artar ve hücrenin pH'sı değişir (Harman, 1992). Lipid peroksidasyonu en fazla plazma membranlarında ve epidermisin yüzey tabakası olan *Stratum corneum*' da gerçekleşir. Oluşan lipid peroksitler hücre membranlarının ve epidermisin fiziksel

özelliklerini etkileyerek biyolojik fonksiyonlarını değiştirmektedirler (Sorg, 2004; Çırak ve ark., 2003).

2.1.3.2. Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri

Yapılan son çalışmalar; proteinlerin biyolojik sistemde serbest radikallerin ilk hedefi olduğunu, DNA ve lipidlerin ise ikincil hedefler olabileceğini göstermektedir. Proteinler canlı organizmada en fazla bulunan komponentlerdir ve ökaryotik hücrelerde moleküler hedeflerin % 75' ini oluşturmaktadırlar (Du ve Gebicki, 2004).

Özellikle doymamış bağ ve sülfür taşıyan protein molekülleri, serbest radikallerle yüksek oranda etkileşim göstermektedirler. Bu nedenle; triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinlerin serbest radikallerden daha fazla etkilendiği, immunoglobulin G ve albumin gibi disülfid bağı taşıyan proteinlerin de yapılarının bozulduğu bildirilmiştir (Meram ve Aktaran, 2002). Serbest radikaller, proteinlerin çapraz bağlanmasına ve protein bantlarının parçalanmasına neden olarak, enzim ve reseptör proteinlerinin yapısına zarar vermektedirler. Hücre içi enzim ve reseptörlerindeki bu değişimler anormal hücre davranışına yol açmaktadırlar (Harman, 1992). Proteinlerle serbest radikallerin etkileşimi sonucunda karbonil türevlerinin oluştuğu bilinmektedir, bu nedenle proteinlerdeki oksidatif hasarı tespit etmek amacı ile protein karbonillerinin seviyesindeki artış değerlendirilmektedir (Samuel ve ark., 2005; Headlam ve Davies, 2004; Ishii ve ark., 2002).

2.1.3.3. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri

Radyasyona bağlı olarak oluşan serbest radikaller, DNA' yı etkileyerek mutasyon ve anormal protein sentezine neden olduklarından gen ekspresyonunda değişikliğe, apoptoz ve hücre ölümüne yol açmaktadırlar (Sorg, 2004). Oluşan DNA hasarının yaklaşık %60'ı suyun radyolizi sonucu ortaya çıkan iyonize radyasyona bağlı olarak gelişmektedir. Burada en zararlı tür oldukça reaktif olan hidroksil radikalidir (Chatgialoglu ve O'Neill, 2001). Hidroksil radikali heterosiklik DNA bazının çifte bağlarına bağlanarak, timinin metil grubundan

veya 2'- deoksiribozun C-H bağından bir hidrojen atomunun kopmasına neden olmaktadır (Evans ve ark., 2004). Hidrojen atomunun kopması, karbon merkezli 2'- deoksiriboz radikalının ve DNA bazlarının C veya N merkezli radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır (Chatgililoglu ve O'Neill, 2001; Evans ve ark., 2004). DNA hasarı en çok 8-oksoguanin (8-hidroksi-2 deoksi guanozin,8-okso-G) ve timin glikol (TG) lezyonu olarak görülmektedir. Hücrelerde radikal maruziyeti sonucu 8-okso-G ve TG seviyeleri artar (Haripriya ve ark., 2004; Bohr, 2002). DNA' daki lezyon, yapının şeklini bozuyorsa ve DNA polimeraz molekülünün gelişimini bloke ediyorsa bu letal bir lezyon olarak tanımlanır. Lezyon yapının şeklini bozmuyor, ancak DNA polimeraz enzimini kolayca yok ederek, DNA' nın aynı kökenden gelmeyen bir baz ile çiftleşmesine neden oluyorsa lezyon premutajenik olarak tanımlanır (Wallace, 2002).

Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğindeki DNA' ya ulaşmakta ve böylece hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve ölümüne yol açmaktadır (Meram ve Aktaran, 2002).

2.1.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı, antimitotik etki göstermektedirler. Bu nedenle kanser ve yaşlanmaya neden olabilmektedirler (Meram ve Aktaran, 2002).

2.1.4. Serbest radikallere bağlı olarak geliştiği düşünülen hastalıklar

Serbest radikallerin üretimi, serbest radikallerin etkisini engelleyen antioksidanların kapasitesini aştığı zaman "oksidatif stres" oluşmaktadır (Scheibmeir ve ark., 2004; Poston ve Raijmakers, 2004; Junqueira ve ark., 2004; Abuja ve Albertini, 2001; Sorg, 2004). Kanser, romatoid artrit, katarakt, yaşlanma, Alzheimer, Parkinson, iskemi/reperfüzyon, inflamasyon, ateroskleroz, oksidatif stres ile ilgisi olduğu düşünülen çeşitli hastalıklardır (Sherman, 1998; Anonim, 2005f; Harman, 1992). Kronik ve dejeneratif hastalıkların en az %

Biyomedikal araştırmalar artan bir Şekilde gösteriyor ki; oksidatif stress tarafından yapılan sürekli atak çoğu major hastalığın başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Oksidatif atıklar yani serbest radikaller, hastalığın ilk oluşum yerinde oluşum nedenini oluşurmakta ve daha sonra vücutta yayılımını drtlemektedirler (Sherman,1998; Anonim, 2005d).

Serbest radikallerin dokulardaki zararının, ateroskleroz ve kalp hastalıklarının nedeni olduğu düşünülmektedir. Oksidatif hasar sonucunda parçalanmış platelet hücrelerinin arter duvarlarına yapışması ve kan kolesterol miktarının yükselmesi arterlere zarar vermektedir. Bu oluşumların tümü damar sertliğinin ilerlemesine sebep olmaktadır. Daha ileri safhalar ise, kardiyovasküler hastalıklar, kalp ile beyne giden kan ve oksijenin azalmasıdır. Oksijenden mahrum kalan dokularda, hastalığın gelişmesini hızlandıran ve kişilerin kalp krizi geçirme riskini arttıran serbest radikal etkisi gözlenmektedir (Sherman,1998).

1980'lerden bu yana toplanan veriler oksidatif hasarın aterosklerotik prostepte önemli rol oynadığını desteklemektedir (Frei, 1994). Aterosklerozun ilerlemesi için lipid peroksidasyonunun gerekli olduğu düşünülmektedir (Abudu ve ark., 2004). Mevcut bilimsel kanıtlara göre, arteriyal lezyonda okside lipoproteinler gözlendiği, hayvan modellerinde antioksidanların lezyon oluşumunu inhibe ettiği ve geciktirdiği rapor edildiği için LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunun hastalık sürecine eşlik ettiği düşünülmektedir (Chisolm ve Steinberg, 2000; Napoli ve Ignarro, 2001). Arteriyal duvarda LDL okside olmakta, makrofaj ve monositler modifiye LDL'yi almakta veya fagosite etmekte ve bu olay "köpük (foam) hücrelerinin" oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Köpük hücreleri "yağ çizgisi (fatty streak)" için gereklidir. Araştırmaların çoğu *in vivo* oluşan LDL oksidasyonunun özellikle aterosklerotik plakta oluştuğunu göstermektedir (Frei, 1994). Süperoksit radikalinin NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi bir çok kaynağı arteriyal duvarda tespit edilmiştir. Nitrik oksit ve süperoksit kolayca peroksinitrit oluşurmaktadır ve peroksinitrit LDL'yi modifiye etme yeteneğine sahiptir (Napoli ve Ignarro, 2001; Stokes ve ark., 2002). Oksidasyon hipotezinin doğal sonucu olarak antioksidanların aterosklerotik plak oluşumunu ve hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılacağı düşünülmektedir. Antioksidanlar, vasküler duvarda bulunan ROT retimi ve salınımını azaltmakta,

endotelial aktivasyonu inhibe etmekte ve nitrik oksitin biyolojik aktivitesini geliştirmektedir (Napoli ve Ignarro, 2001). Ancak son zamanlarda vitamin E ile yapılan çeşitli çalışmalarda negatif sonuçlar alınmıştır (Heinecke, 2002; Napoli ve Ignarro, 2001).

İskemi, hücrede bulunan oksijen miktarının hücrenin ihtiyaı olan miktarı karşılayamaması durumudur (Lee ve Maclean, 2003). Hipoperfüzyon nedeniyle miyokardiyumdaki oksidatif metabolizmanın yetersiz kalması sonucu sekeller oluşmaktadır. İleri hipoperfüzyon durumlarında beslenmenin yetersiz kaldığı kalp kası bölgelerinde nekroz gelişmektedir. Koroner kan akımının artmasıyla da iskemik kalp kası reperfüzyonla yeniden oksijenlenmektedir. Reperfüzyon durumunda iskemik hasar artabilmektedir. Bu durum “iskemi-reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılmaktadır (Frei, 1994). Bunun nedeni, iskemi sırasında ksantin oksidaz enziminin sentezinin, etkinliğinin ve substratlarının artması ve böylece, enzimin reperfüzyon sırasında dokuda konsantrasyonu birden artan oksijeni aşırı miktarda süperoksit anyonuna dönüştürmesidir (Kayaalp, 2000). Reperfüzyon kaynaklı oksidatif stresin kalp kası hasarını arttırdığı düşüncesi yapılan çeşitli çalışmalarla desteklenmektedir (Frei, 1994; Cuzzocrea ve Reiter, 2001). Ayrıca, bu süreçte söz konusu serbest radikaller, mitokondriyal solunum ve aktif nötrofiller tarafından da üretilmektedir (Moens ve ark., 2004). Miyokartta süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit gibi serbest radikaller tespit edilmiştir (Frei, 1994). Ayrıca vitamin E gibi radikal süpürücü antioksidanlarla yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarı üzerinde olumlu etkiler saptanmıştır. Miyokardiyal membranlar daha çok fosfolipid ve proteinlerden oluşmuştur. Membran proteinlerinin serbest radikallerin etkileriyle değişimi iskemi-reperfüzyon sürecinin gelişiminde önemli bir faktördür. Ayrıca antioksidan savunmanın baskılandığı durumlarda, lipid membranlarının peroksidasyonu da membran bütünlüğünün bozulmasına, nekroz ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Moens ve ark., 2004). Giderek artan kanıtlar serbest radikallerin merkezi sinir sisteminde de iskemi-reperfüzyon hasarı ile bağlantılı nöronal lezyon oluşmasında rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir. Yine beyin, böbrek, akciğer ve karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarında serbest radikal oluşumu gösterilmiştir (Cuzzocrea ve Reiter, 2001; Marubayashi ve ark., 2000; Cui ve ark., 2004). Bütün

bunlara rağmen, iskemik-reperfüzyon hasarı için oksidatif stresin zorunlu olduğunu gösteren kesin kanıt henüz yoktur (Frei, 1994).

Çok sayıda araştırma, süperoksit, hidrojenperoksit ve hidroksil gibi radikallerin inflamasyon bölgesinde oluştuğunu ve doku hasarına neden olduğunu göstermektedir (Cuzzocrea ve Reiter, 2001). İstilacı organizmalar ile mücadelede inflamatuvar cevabın yararlı etkileri olmasına rağmen, kontrol dışına çıkan cevaplar ve kronik inflamasyonun romatoid artirit gibi hastalıkların temelini oluşturduğu indirekt kanıtlarla gösterilmiştir (Frei, 1994; Cuzzocrea ve Reiter, 2001) İnflamasyonda nitrik oksit ve sitokinlerin artışı sözkonusudur (Boveris ve ark., 2002). Artiritli hastalarda nitrik oksite ilaveten peroksinitritin de üretildiği gösterilmiştir (Cuzzocrea ve Reiter, 2001).

Dokulardaki mitokondrilere zarar veren ağır inflamatuvar yanıtla birlikte septik şok meydana gelmektedir. Septik şokta nitrik oksit miktarının arttığı gözlenmektedir. Nitrik oksit sentaz tarafından bu süreçte aşırı nitrik oksit üretimi sonucu aşırı miktarlarda oluşan peroksinitritin mitokondriyal matriks proteinlerini azotlayarak mitokondriyal disfonksiyona uğratması önemli bir moleküler mekanizma olarak bilinmektedir (Boveris ve ark., 2002; Cuzzocrea ve Reiter, 2001).

Ayrıca serbest radikallerin çok sayıda nörolojik hastalıkta rolü olduğu da kabul edilmektedir. Nöronlar ve beyin kolayca peroksidede olabilen poliansatüre yağ asiti içerirler, demirce zengindirler ve sadece basit antioksidan savunma mekanizmalara sahiptirler. Bu faktörler beyin ve nöronları oksidatif strese karşı duyarlı hale getirmektedir. Ayrıca beyinin toplam vücut oksijeninin %20' sini tüketmesi bir çok serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (Harman, 1992; Frei, 1994; Cui ve ark., 2004). Serbest radikallerin apoptoz veya nekroz ile nöronal ölüme yol açtıkları tesbit edilmiştir. Ayrıca Alzheimer, Parkinson ve amiyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların patojenezinde de yer aldıkları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda antioksidanların nöronal ölümü önlemesi bu fikri desteklemektedir. Oksidatif stresin transkripsiyonel faktör olan nükleer faktör- κ -B'nin aktivasyonunu etkilemesi bu hastalıklardaki önemli diğer bir bulgudur. Bu faktör apoptozu inhibe eden proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu hastalığı taşıyan kişilerde merkezi sinir sisteminin zayıf

bir bulgudur. Bu faktör apoptozu inhibe eden proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu hastalığı taşıyan kişilerde merkezi sinir sisteminin zayıf bölgelerinde NF- κ -B'ye artmış miktarlarda rastlanmaktadır. Yine oksidasyona uğramış DNA'nın belirleyicisi olan 8-okso-G düzeyi nörodejeneratif hastalık taşıyan kişilerde yüksek olarak bulunmuştur (Esposito ve ark., 2002). Serbest radikallerin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon da nöronal ölüme yol açabilmektedir (Callaway ve ark., 1998).

Lipid peroksidasyonu, iskemik yaralanma gibi nöronal hasarların ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların önemli bir nedeni olmaktadır (Callaway ve ark., 1998). Parkinson hastalığında oksidatif stres sonucunda nigrostriyal hücre kaybı tesbit edilmiştir. Aktif glial hücreler Parkinson hastalığında nörodejenerasyon bölgelerinde görülmüştür. Bu olay apoptozun potansiyel mediyatörü olan TNF- α (tümör nekrozis faktör) gibi çeşitli sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin üretimiyle birlikte sinir hücresi ölüm mekanizmasında yer almaktadır (Cui ve ark., 2004).

Alzheimer hastalığı yaşa bağlı olarak gelişen klinik bulgu olarak hafıza ve kavrama kaybı, patolojik bulgu olarak da senil plak, nörofibril karışıklığı ve sinaps kaybı ile karakterize bir hastalıktır. Lipid ve protein peroksidasyonu ve diğer oksidatif hasar belirtileriyle ortaya çıktığı çeşitli çalışmalarla desteklenmektedir (Butterfield ve Lauderback, 2002). β -amiloidoz agregasyonu ve β -amiloidozda reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda bulunması, oksidatif stresle nörotoksisite arasındaki bağlantı için önemli bir kanıt oluşturmaktadır (Cui ve ark., 2004).

Amiyotrofik lateral skleroz, motor nöron hastalığı olarak bilinmektedir ve serebral korteks, spinal kolon ve beyin sapında motor nöronların dejenerasyonu ile karakterizedir. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi azalmasının spinal kolonda motor nöronların dejenerasyonuna neden olduğuna ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. SOD geninde mutasyonlar da mevcuttur, ancak hastalık ile bağlantısı henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır (Cui ve ark., 2004).

Down sendromu, mental yavaşlama, erken yaşlanma ve bunama gibi sinir sistemi üzerinde etkilerle görünen patolojik özelliklerle karakterize bir hastalıktır. Oksidatif stresin down sendromunun nöropatolojik kısmında rolü olduğu

DNA ve mitokondriyal disfonksiyonlarının da eşlik ettiği görülmektedir (Cui ve ark., 2004).

Yaşlanma, geçen zamana bağlı olarak ilerleyen yaşla birlikte gelişen ve kaydettiği ilerleme ile hastalık ve ölüm şansını arttıran ardışık değişimlerin birikimidir. Bu değişiklikler hastalıkla, çevresel faktörlerle, immün disfonksiyonla veya genetik özelliklere bağlı olarak oluşabilmektedir. Yaşlanma ile ilgili birçok teori ileri sürülmüştür. İçlerinden bir tanesi günümüzde geniş ölçüde kabul görmektedir (Ashok ve Ali, 1999). İlk kez 1956'da Harman tarafından sürülen yaşlanmanın serbest radikal teorisine göre yaşlanmaya oksidatif hücre ve doku hasarı neden olmaktadır (Asho ve Ali, 1999; Junqueira ve ark., 2004). Yaşlılıkla oluşan hastalıkların majör belirleyicisinin oksidatif stres olması olasılığı bu teoriyi desteklemektedir (Junqueira ve ark., 2004). Yaşlanma sürecinde kanıtlanan neden-etki ilişkileri; molekül içi ve moleküllerarası çapraz bağlanma oluşumu; immunolojik reaksiyonlarda değişimler; hücre poliferasyonunun yarıda kesilmesi veya azalmasıyla telomerde kısalma; ilerleyen yaşla antioksidan enzim düzeylerinin azalması ve serbest radikal hasarının daha çok hissedilmesi; yaşa bağlı değişikliklerle gen aktivasyonudur (Ferrari ve Torres, 2003). Endojen yıpranma işlemine en çok katkı yapan unsur oksidatif DNA harabiyetidir yani aerobik hücresel metabolizmanın sürekli olarak ürettiği ROT' nin ürünüdür (Yaar, 2002).

Vitamin E ve A gibi antioksidanlar, genç bireylerin plazmasında yaşlı bireylere göre daha fazla saptanmıştır (Junqueira ve ark., 2004).

Ayrıca, serbest radikallerin organizmada birikimi; cilt kırışıklığı, saç beyazlaşması ve dökülmesi, kepek oluşumu, vücut sertleşmesi gibi yaşlanmanın rahatsız edici semptomlarına katkıda bulunmaktadır (Sherman, 1998).

Yaşlanma ile birlikte, insan lens proteinleri yavaş ama progresif bir sarılaşmaya uğramakta ve bunun katarakta neden olduğu bilinmektedir. Sarı pigmentler oksidatif hasara yol açmakta ve lens proteinlerinin fotopolimerizasyonunu hızlandırmaktadır (Dillon ve ark., 1999). Katarakt, normalde saydam olan lensin opak yani ışık geçirmez duruma gelerek görmede kayıp ile sonuçlanan patolojik bir olgudur. Lensin oksidanları kısmen detoksifiye etme yeteneği olmasına karşın lens saydamlığının kaybında oksidanların anahtar

faktör olduğu düşünülmektedir. Lens proteinlerindeki tiyollerin oksidasyonu katarakta açıkça görülmektedir. Protein tiyollerinin oksidasyonu Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz'ı inaktive etmekte, anormal iyon gradiyentleri oluşmakta ve selüler zedelenme meydana gelmektedir. Glutasyon, lens epitelyal hücrelerinin major bileşenlerinden biridir ve katarakta miktarının azaldığı görülmektedir (Frei, 1994).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastas yapması ile kendini gösteren öldürücü bir hastalıktır (Kayaalp, 2000). Kansere katkısı olduğu bilinen önemli mekanizmalardan biri de DNA'nın oksidatif hasara uğramasıdır. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, kanserin yanlış beslenme, genetik faktörler ve çevresel faktörler gibi değişik nedenlerle oluştuğu düşünülmektedir (Reddy ve ark., 2003)

Serbest radikal oluşumuna neden olan radyasyon, kanserin başlamasına ve ilerlemesine neden olabilmektedir. DNA, radyasyondan yayılan enerjiyi direkt olarak absorbe etmekte ve kanser oluşumuna neden olabilecek DNA hasarları oluşmaktadır (Frei, 1994). Oksidatif DNA hasarlarının, yaşa bağlı olarak ortaya çıkan kolon, prostat, rektum ve meme kanseri gibi major kanser türlerinin gelişiminde rol oynadığına inanılmaktadır (Halliwell, 2002). Serbest radikaller, in vitro memeli hücrelerinde mutajenik etki göstermekte ve tümör oluşumu ile gelişiminde rol oynamaktadırlar. Oluşan organik peroksitler birikerek tümör promoteri olarak işlev görebilmektedir (Frei, 1994). Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalar ile oksidatif hasarın kansere neden olduğunu gösteren direkt kanıtlara ulaşılamamıştır (Halliwell, 2002; Olinski ve ark., 2003). Tek başına oksidatif DNA hasarı kanser oluşturmaya yetmemekte veya sadece belli bir alandaki hasar kanser etkisi gösterebilmektedir. Oksidatif hasar "junk DNA" alanında oluşmuşsa önemli bir biyolojik etki gözlenmemekte, ancak işlevsel proteinleri kodlayan genler üzerinde ise kanser açısından önemli sonuçlar doğurabilmektedir. Ne yazık ki, günümüzde hasarların tam olarak nerede oluştuğunu gösterebilecek teknikler henüz mevcut değildir. DNA'da oksidatif hasar oluşumunu önlediği bilinen antioksidanların kanser gelişimini de önlemesi beklenmektedir (Halliwell, 2002). Koruyucu etki mekanizmaları tam olarak bilinmemesine rağmen, antioksidan içeren meyve ve sebzeler ile beslenmenin kansere yakalanma riskini düşürdüğü

çoğu çalışmada gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2003). Ancak yapılan bazı çalışmalar ile, çeşitli antioksidan vitaminlerin oksidatif hasarı önlemediği ve hatta bazı çalışmalarda da oksidatif hasara bağlı hastalığın insidansını arttırdığı gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2003; Olinski ve ark., 2003). Oksidatif DNA hasarının kansere neden olduğu kanıtlanamamasına rağmen, elde edilen veriler DNA hasarının oranının biyolojik önemi olduğunu göstermektedir (Halliwell, 2002). DNA bazlarındaki değişimler, karsinogenezi başlatan mutasyonların kaynağı olarak bilinmektedir. Hidroksil radikali, DNA'da pirimidin ve purin türevi çok sayıda lezyona neden olmaktadır. Değişime uğramış bu DNA bazlarının bir kısmı genomun bütünlüğüne zarar verebilecek güce sahiptir (Olinski ve ark., 2003). DNA lezyonlarından en iyi bilinen 8-okso-G'dir ve mutajenik özelliktedir. 8-okso-G kalıntıları, DNA replikasyonu gerçekleşmeden önce onarılmaması halinde GC→TA transversiyonuna yol açmaktadır. 8-okso-G'nin hücrelerde varlığı nokta mutasyonlara neden olmaktadır (Olinski ve ark., 2003; Halliwell, 2002). Oksidatif DNA hasarının miktarı, idrarda 8-okso-G miktarı ile veya dokulardan alınan izole DNA'daki oksidatif hasar ürünlerine bakılarak anlaşılmaktadır (Halliwell, 2002). Çoğu araştırmacı 8-okso-G ile karsinogenez arasında direkt korelasyon göstermiştir (Olinski ve ark., 2003).

Kimyasal, biyolojik ve fiziksel nedenlerle oluşan kronik inflamasyon, çeşitli bölgelerde kanser riskini arttırmaktadır. Çünkü inflamasyon çeşitli inflamatuvar hücreleri aktive etmekte ve aktive olan bu hücreler de NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz, eozinofil peroksidaz, NOS gibi oksidan üretimine neden olan enzimlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu enzimler, daha güçlü reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumunu sağlayan, süperoksit, azot dioksit, hidrojen peroksit, hidroklorik asit, nitrik oksit gibi serbest radikallerin üretilmesine neden olmaktadır. Bu radikal türleri DNA, RNA, lipid ve proteinleri azotlayarak, oksitleyerek, klorlayarak veya bromlayarak hasara uğratmakta ve mutasyonların artmasına, enzim ve proteinlerin işlevlerinin değişmesine ve sonucunda da kanser riskinin artmasına neden olmaktadır (Ohshima ve ark., 2003).

2.2. Antioksidanlar

Antioksidan teriminin anlaşılabilmesi için, öncelikle 'oksidasyon' teriminin anlamının bilinmesi gerekmektedir. Oksidasyon, önceleri bir maddeye oksijen katılması olarak nitelenmiş olsa da, günümüzde kimyasal bir maddenin daha az elektron taşıyan başka bir maddeye dönüşümü olarak tanımlanmaktadır. Bu durumda, oksidasyon bir veya daha fazla elektronun, bunları kabul eden bir başka maddeye transferi ile asıl maddenin indirgenmesidir (Larson, 1997). Yapılan çalışmalar maddelerin oksidatif olarak bozulmasının serbest radikal oluşum prosesleri ile gerçekleştiğini göstermektedir (Rice-Evans ve ark, 1991).

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini önleyen veya ortadan kaldıran maddelerdir (Anonim, 2005k).

Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek oranda antioksidan tüketen ve kan antioksidan madde konsantrasyonları yüksek olan bireylerde, belli dejeneratif hastalıkların daha düşük oranda ortaya çıktığını göstermektedir. Klinik çalışmalar da, antioksidan vitamin seviyesi yüksek olan bireylerde, çeşitli kanser ve kardiyovasküler hastalıkların gelişme riskinin azaldığını göstermektedir (Anonim, 2005i).

Ayrıca antioksidanların toksik oksidasyon ürünlerinin oluşmasını engellenmesi ve gıdaların besin kalitesinin muhafaza edilmesinde önemli rolleri bulunmaktadır. Gıdalardaki lipid bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyarak kalitesini devam ettirmek ve kötü kokuyu engellemek için katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Um ve ark., 2005). Böylece gıdaların raf ömrünün uzamasını sağlamaktadırlar (Anonim, 2005i).

Vücutta serbest radikalleri nötralize eden, oldukça etkili üç antioksidan sistemi bulunmaktadır. Bunlar;

Vitaminler; vitamin C, tokoferoller, ve β -karoten ve diğer düşük molekül ağırlıklı bileşikler (glutatyon ve ürik asit gibi)

Enzimler; bakır, çinko veya mangan içeren süperoksit dismutaz, demir içeren katalaz ve selenyum içeren glutatyon peroksidaz

Proteinler; transferrin, ferritin ve seruplasmin gibi metal bağlayan proteinler (Frei, 1994; Elmer ve ark., 2001).

2.2.1. Antioksidan etki mekanizmaları

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidirler. Antioksidanlar etkilerini şu şekillerde göstermektedirler:

1:Reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştürmektedirler. Örneğin; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz

2: Radikalleri yakalayıp nötralize ederek etki gösterebilmektedirler. Bu etkiye süpürücü etki de denmektedir. Örneğin; vitamin E, vitamin C, glutatyon, ürik asit, β -karoten, albumin.

3: Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyerek ve oluşanın yayılmasını engelleyerek etki gösterebilmektedirler. Örneğin; ferritin, transferin, seruloplazmin, laktoferin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşmuş radikalleri suya indirgeyen mitokondriyal sitokrom oksidaz (Kayaalp, 2000).

2.2.2. Antioksidan çeşitleri

i) Doğal antioksidanlar

a) Enzimatik Antioksidanlar;

Süperoksit dismutaz, katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz

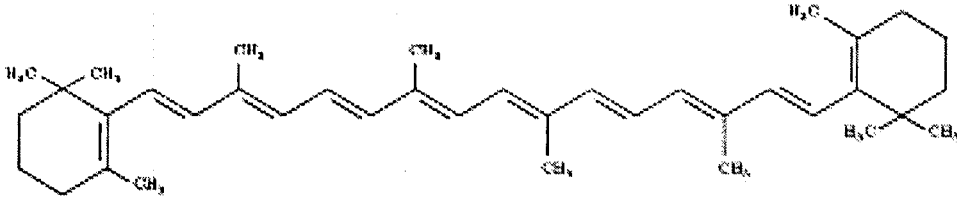
b) Enzimatik Olmayan Antioksidanlar;

Vitamin C, Vitamin E, Vitamin A, fenolik bileşikler, melatonin, ürik asit, albumin, haptoglobulin ve hemopeksin, seruloplazmin, transferin ve laktoferrin ferritin, bilirubin, lipoik asit, probukol, deferoksamin (Anonim, 2005e).

ii) Sentetik antioksidanlar

Besin maddelerine antioksidan ilavesi, gelişmiş ülkelerde devletin getirdiği birtakım kurallara bağlıdır. Amerika'da besin maddelerine ilave edilen antioksidan maddelerin, kullanım amacı ile birlikte, etikette mutlaka belirtilmesi istenir (FDA) (Shahidi ve Naczki, 2004). Günümüzde besin maddelerine ilave edilmesine izin verilen sentetik antioksidanlar gallatlar [Oktil gallat ($C_{10}H_{22}O_5$), dodesil gallat ($C_{19}H_{30}O_5$), propil gallat ($C_{10}H_{12}O_5$)], BHT (bütilenmiş hidroksi toluol), BHA (bütilenmiş hidroksianisol), TBHQ (tersiyer butil hidrokinon, $C_{10}H_{14}O_2$) dur (Perrin ve Meyer, 2002; Dunn, 2004; Suja ve ark., 2004).

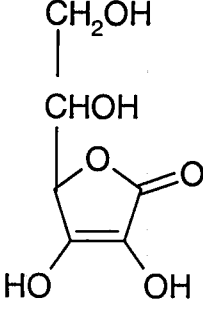
2.2.2. 1. Vitamin A ve β -karoten



Karotenoidler, bitki meyve ve köklerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan sarı, turuncu ve kırmızı pigmentlerdir (Larson, 1997; McGill ve ark., 2003). Hücrede fotosentetik kloroplastlarda bulunmaktadır. β -karoten, karotenoidlerin en çok bulunan ve hakkında çalışma yapılan türüdür (Larson, 1997). β -karoten, taze patates, yumurta sarısı, havuç, kavun, turunçgiller, kayısı gibi gıdalarda ve ıspanak gibi yeşil yapraklı sebzelerde bulunmaktadır (Anonim, 2005j; 2005k). A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten son derece güçlü bir singlet oksijen temizleyicisidir. Ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyona girerek, lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedir (Larson, 1997). β -karotenin kardiyovasküler hastalıklar, felç ve çeşitli kanser türlerine yakalanma riskini azalttığı düşünülürken (McGill ve ark., 2003; Palozza ve ark., 2003), son yapılan çalışmalar bu hastalıklar üzerine koruyucu etkisi olmadığını göstermiştir (Siebert ve Kruk, 2004; Zhang ve Omaye, 2000). Ayrıca β -karoten-retinol kombinasyonunun akciğer kanseri riskini

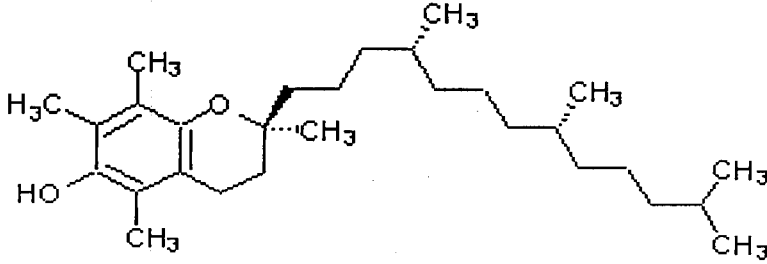
arttırdığı saptanmıştır. Serbest radikal üretimini azalttığı bilinen β -karotenin, yüksek dozlarda, bazı tümör hücrelerinde serbest radikal üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Palozza ve ark., 2003).

2.2.2. 2. Vitamini C (askorbik asit)



Özellikle taze yeşil sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunmaktadır (Aliste ve Del Mastro, 2004). Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C vitamini süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizlemektedir (Nordberg ve Arnér, 2001). Vitamin C plazma lipoproteinlerinde lipid peroksitlerin oluşumunu engellemektedir. Bu temizleyici etkilerini lipid peroksitleri ile reaksiyon sonucu oluşan α -tokoferol radikallerini redükte ederek göstermekte ve yine bu mekanizma ile membran lipidleri üzerinde koruyucu etki sağlamaktadır (Conklin, 1998). Aterosklerotik plak oluşumuna karşı koruyucu etkisi de bu mekanizma aracılığı ile gerçekleşmektedir. Askorbik asit ve GSH intraselüler sulu fazda, hücreyi oksidatif hasardan korumak için birlikte çalışmaktadırlar (Nordberg ve Arnér, 2001). Metal içeren sulu sistemlerde, vitamin C pro-oksidan olarak davranmakta ve metalleri redükte ederek oksidasyon katalizatörü görevi üstlenmektedir (Aliste ve Del Mastro, 2004). Ayrıca, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engellemektedir (Conklin, 1998).

2.2.2. 3. Vitamin E ve tokoferoller



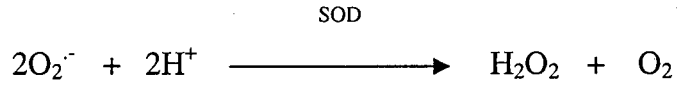
E vitamini tokoferol yapısında olup, α -, β -, γ - ve δ - olarak dört tipin karışımı halinde bulunmaktadır. Doğada en yaygın biçimde bulunan α -tokoferol, biyolojik aktivitesi ve antioksidan etkisi en fazla olan tiptir. Vitamin E, en yüksek oranda mitokondri ve mikrozoimler gibi membranca zengin hücre kısımlarında bulunmaktadır (Larson, 1997). Bütün tokoferoller genellikle bitkisel yağlardan elde edilmektedir. Yapılan çalışmalar, özellikle ateroskleroz ve iskemik kalp hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıkların ve çeşitli tümörlerin oluşumunun önlenmesinde rolü olduğunu göstermektedir (Azzi ve ark., 2002; MacDonald-Wicks ve Garg, 2003). Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu hastalıklara yakalanma riskini değiştirmediği ortaya konmuştur (Kritharides ve Stocker, 2002; Vivekananthan ve ark., 2003). İçerdiği hidroksil grubu sayesinde, peroksil radikallerinde olduğu gibi, eşleşmemiş elektron içeren gruplara etki ederek onları indirgemektedir (Nordberg ve Arnér, 2001). Bulunduğu biyolojik ortamlardaki serbest radikal türlerini süpürerek, peroksidasyonun erken döneminde, zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin korunmasında, oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Ayrıca, peroksidasyon zincirini sonlandırarak singlet oksijen, süperoksit ve daha çok hidroksil radikallerini indirgemektedir. Uzun bir süre, antioksidan aktivitesinin sadece bu reaksiyon zincirini sonlandırmasına bağlı olarak gerçekleştiği kabul edilmesine karşın bugün vitamin E'nin radikal temizleme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının tümünü kullanabildiği, bu nedenle de çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. γ -tokoferol, hücre genetik yapısı üzerinde güçlü bir mutajen olan peroksinitritin

oluşum reaksiyonlarının önlenmesinde ve hem peroksil hem de nitrik oksitin birikimine karşı bir antioksidan olarak rol almaktadır. Güçlü bir antioksidan olması nedeni ile Vitamin E, hücrelerdeki protein sentezi ve membran oluşumu gibi son derece önemli işlevleri oksidasyon riskine karşı korumaktadır (Dündar ve Aslan, 2005; Larson, 1997).

2.2.2.4. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, iki süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalize eden bir metalloenzimdir . Bu reaksiyon 'oksidatif strese karşı ilk savunma' sistemini oluşturmaktadır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri bu sistem sayesinde kontrol altında tutulmaktadır (Larson, 1997; Turrens, 2004; Henkle-Dührsen ve Kampkötter, 2001).

Reperfüzyona bağlı bozuklukları düzelttiği bulunmuştur ve iltihap dokusunda meydana gelen serbest oksijen radikallerini nötralize ettiği için romatoid artrit tedavisinde denenmektedir (Kayaalp, 2000).



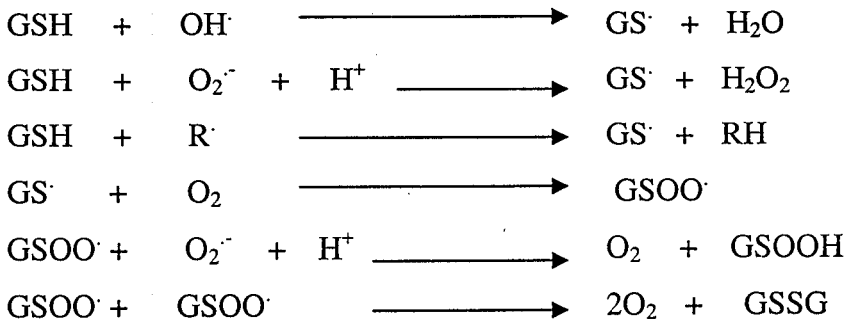
2.2.2.5. Katalaz

Katalaz esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 'hem' grubu bulunan bir hemoproteindir (Zámocký ve Koller, 1999; Turrens, 2004). Karaciğer ve eritrositlerde yüksek aktiviteye sahiptir. Katalaz, SOD aracılığıyla oluşan, bir radikal olmamasına karşın en reaktif serbest radikal olan HO• radikalinin öncüsü olan ve bu nedenle birçok serbest radikalden daha fazla oksidatif hasara neden olan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene parçalanmasını sağlamaktadır (Larson, 1997; Turrens, 2004). Ayrıca bakır veya demirin katalize ettiği fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitin hidroksile dönüşümünü en aza indirmektedir (Nordberg ve Arnér, 2001). NADPH, katalaz enzimine bağlanarak enzimin inaktive olmasını önlemekte ve etkinliğini artırmaktadır (Henkle-Dührsen ve Kampkötter, 2001; Zámocký ve Koller, 1999).



2.2.2.6. Glutasyon (GSH)

GSH gibi sülfidril içeren moleküller, hücrede fizyolojik pH'larda işlev gören aktif indirgen bileşiklerdir (Camera ve Picardo, 2002). Önemli bir intrasellüler antioksidandır. Ekstrasellüler aralıkta çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Glutasyon, glutemik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş olan bir tripeptittir (L- γ -glutamil-L-sistein-glisin, GSH) (Dröge, 2002; Townsend ve ark., 2003). İntrasellüler GSH'ın yaklaşık beşte biri mitokondride yer alır (Dröge, 2002). Glutasyon, NO, O₂⁻, HO[•] ve singlet oksijen gibi ROT'ini temizler (Camera ve Picardo, 2002) ve glutasyon peroksidaz aracılığı ile peroksitlerin indirgenmesinde elektron verici olarak görev almaktadır (Camera ve Picardo, 2002). Glutasyonun en iyi bilinen fonksiyonu selenyum içeren bir enzim olan glutasyon peroksidazın substratı olmasıdır. Ayrıca glutasyon, H₂O₂ ile direkt okside olma yeteneğine sahip çok az sayıdaki antioksidandan bir tanesidir (Larson, 1997). Bunun dışında proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza etmektedir. Demirin Fe⁺² (ferro) halde tutulmasını sağlamaktadır. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller ve rejenere olmalarını sağlar (Camera ve Picardo, 2002). N-asetil sistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırmaktadır (Anonim, 2005e). Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar sırasında GSH tüketilmemekte, yeniden kullanılabilir hale getirilmektedir. Ancak glutasyon-S-transferaz tarafından katalize edilen reaksiyonda GSH miktarı azalır (Camera ve Picardo, 2002).



2.2.2.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

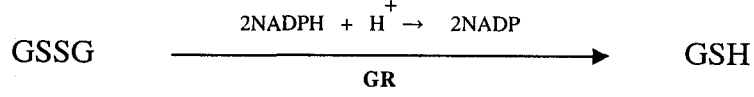
Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir (Turrens, 2004). Bu enzim 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir ve sitozolde yerleşmiştir (Imai ve Nakagawa, 2003). Aktivitesi karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kaslarda ise düşük seviyededir.

Aşırı hidrojenperoksit varlığında, GPx, iki molekül glutasyonun (GSH) arasında disülfid köprüsü kurarak, okside glutasyon (GSSG, glutasyon disülfid) oluşumunu katalize etmektedir. Bu arada H_2O_2 de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur. GSSG, NADPH'ın elektron donörü olarak tüketilmesi sonucu tekrar GSH' a dönüşmektedir (Camera ve Picardo, 2002; Imai ve Nakagawa, 2003).

Selenyum içeren GPx' in 4 türü vardır. GPx1 yani klasik GPx, kırmızı kan hücrelerini oksidasyon nedeni ile hemoliz olmaktan korumaktadır. Sitozolik veya sellüler GPx olarak da bilinir. Yağ asidi hidroperoksit gibi yüksek polariteye sahip organoperoksitlerin ve H_2O_2 'nin indirgenmesini katalize etmektedir. Gastrointestinal sistemde bulunan GPx2 (GPx-GI) sitozolde meydana gelmektedir. GPx1 ile benzer yapıdadır ve aynı şekilde etki göstermektedir. İnsanlarda GPx-GI mRNA sadece karaciğer ve bağırsakta bulunurken, ratlarda GPx-GI mRNA çoğunlukla gastrointestinal sistemde bulunmaktadır. Üçüncü form olan GPx plazmada bulunur ve pGPx veya ekstraselüler GPx olarak adlandırılır. Daha çok böbrekte proksimal tübülün epitelyal hücrelerinde bulunur. Dördüncüsü ise fosfolipid hidroperoksit GPx' dir. Diğer türlerin fosfolipid hidroperoksitler üzerine etkisi bulunmazken, bu tür etkilidir. Fosfolipid hidroperoksit GPx en fazla testislerde tesbit edilmiştir (Imai ve Nakagawa, 2003).

2.2.2.8. Glutasyon Redüktaz (GR)

Daha önce de belirtildiği gibi, GPx tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin redüksiyonu sırasında, glutasyon, okside GSH' a dönüşür. Bu okside formun daha sonra tekrar kullanılabilmesi için tekrar redükte GSH' a dönüştürülmesi gerekir. Çünkü organizmanın GSH deposu sınırlıdır. GR, NADPH varlığında GSSG tekrar redükte GSH çevirir (Camera ve Picardo, 2002; Imai ve Nakagawa, 2003).



2.2.2.9. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

GST değişik türlerdeki elektrofilik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu katalize eder. GST sellüler detoksifikasyon sisteminin önemli bir kısmını oluşturmakta ve hücreyi ROT' ne karşı korumaktadır. Bütün ökaryotik ve prokaryotik sistemlerde, sitozol, mikrozomlar ve mitokondride bulunmaktadır (Landi, 2000). Membrana bağlı mikrozomal ve sitozolik GST olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır (Townsend ve ark., 2003). Mikrozomal GST lökotrienlerin ve prostaglandinlerin endojen metabolizmalarında anahtar rol oynamaktadır (Townsend ve ark, 2003).

GST'ler organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Bladeren, 2001). GST'lar başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi göstermektedirler (Anonim, 2005e). DNA hidroperoksitleri, hidroksialkenal ve propenal bazı gibi zararlı bileşikleri detoksifiye etmektedir (Bladeren, 2001). Antioksidan aktivitelerine ilaveten çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Hem, bilirubin ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddeleri reversibl olarak bağlayarak bunların hücre içi transportunda görev almaktadırlar (Anonim, 2005e)

2.2.2.10. Melatonin

Memelilerde pineal bezden salgılanan bir ürün olan melatonin (*N*-asetil-5-metoksitriptamin) HO' radikalini temizleyen çok güçlü bir antioksidandır. HO' nun yanı sıra hidrojen peroksit, nitrik asid, peroksinitrit ve peroksinitrik asiti de süpürmektedir (Reiter, 2003; Vijayalaxmi, 2004). HO' ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşmektedir. Bu da ortamdaki O₂⁻ radikalini tutarak antioksidan aktivite göstermektedir. Lipofilik olması nedeniyle hücrenin hemen tüm organellerine ve birçok dokuya rahatça girerek geniş bir alanda aktivite göstermesi, hücre çekirdeğine girebilmesi nedeniyle DNA'yı oksidatif hasara karşı koruması, çok yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımında bile

toksik bir etki göstermemesi ve prooksidan aktivite göstermemesi diğer antioksidanlara oranla daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır (Anonim, 2005e).

Ayrıca, SOD, GPx, GR gibi antioksidan enzimleri stimüle ederken, NOS gibi prooksidatif enzimi de inhibe etmektedir (Reiter ve ark., 2002; Okatani, 2002).

Yaşlanma ile birlikte melatonin de azaldığı için yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı bazı hastalıkların patojenezinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Martínez-Cruz ve ark., 2002; Karasek, 2004).

2.2.2.11. Ürik asit

Pürin nükleotidleri katabolizasyonunun son ürünü olan ürik asit (Kochansky ve Strein, 2000) veya 8-hidroksantin, pürin yapısında olan oldukça aktif bir antioksidandır. Antioksidan aktivitesi pH ile artar, pH 3' te etkisizdir, pH 5' te orta derecede etkilidir ve pH 7 üstünde oldukça etkilidir (Larson, 1997). Normal plazma konsantrasyonlarında lipid radikalleri dışında tüm serbest radikalleri temizlemektedir (Anonim, 2005e). Ürik asitin antioksidan aktiviteye sahip olmasına neden olan bir diğer mekanizma metal iyonları ile kompleks oluşturabilmesidir. Ürik asit bakır tarafından indüklenen fenton reaksiyonunu inhibe ederek H₂O₂'nin HO[•] radikaline dönüşümünü önlemektedir (Larson, 1997).

Ürik asit aynı zamanda LDL oksidasyonu sırasında prooksidan gibi davranarak ROO[•] veya bakırın indirgemisini sağlamaktadır (Sanguinetti ve ark., 2004).

2.2.2.12. Albümin

Albümin içerdiği çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını sıkı olarak bağlamakta ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu ile HO[•] oluşumunu inhibe etmektedir. Albümin aynı zamanda etkin bir HOCl temizleyicisidir, kanda serbest yağ asitlerini taşımakta ve bilirübini bağlamaktadır. Bu bağlı bilirübünün de antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Anonim, 2005e).

2.2.2.13. Bilirubin

“Hem” katabolizmasının sonucunda oluşan safra pigmenti bilirubinun lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve HO[•] ve H₂O₂ radikallerinin temizleyicisi olduğu bilinmektedir (Anonim, 2005e).

2.2.2.14. Seruloplazmin

Plazmada major bakır içeren proteindir. Seruloplazmin ferro-oksidad aktivitesi göstererek Fe⁺²'i, Fe⁺³'e okside etmektedir. Böylece Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe etmektedir. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu önleyici etki göstermektedir. Aynı zamanda bir akut faz reaktanıdır ve inflamasyonda seviyesi artmaktadır (Anonim, 2005e).

2.2.2.15. Ferritin

Dokulardaki demiri bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarında yer almasını engellemektedir (Anonim, 2005e).

2.2.2.16. Transferin ve Laktoferrin

Transferin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar ve serbest radikal oluşumunu önlemektedir (Anonim, 2005e).

2.2.2.17. Haptoglobin ve Hemopeksin

Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek gerekse doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin “hem”i bağlayarak bu demir bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu uyarmasını engellemektedir (Anonim, 2005e).

2.2.2.18. Probukol

Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan bir ilaç olup güçlü antioksidan özelliği vardır. Lipid peroksidasyon zincirini kırıcı özellik taşımaktadır (Anonim, 2005e).

2.2.2.19. Deferoksamin (DFO)

DFO, Fe⁺³'ü bağlar ve oluşan bu kompleksteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede serbest radikal oluşumuna katılamaz (Anonim, 2005e).

2.2.2.20. Lipoik Asit

Metabolizma ve enerji üretiminde yer alan çeşitli mitokondrial enzimlerin ko-faktörü olarak bulunan doğal bir bileşiktir (Cadenas ve Packer, 2002). Lipid peroksidasyonunu önlemektedir. HO[•] ve singlet oksijen toplayıcısıdır. H₂O₂'i indirgemektedir. Vitamin E tüketimine karşı koruyucudur (Anonim, 2005e).

2.2.2.21. Polifenolik bileşikler

Fenolik bileşikler antioksidan aktivite kapasitelerinden ve sağlık üzerine gösterdiği yararlı etkilerden dolayı son yıllarda dikkat çeken bir konu haline gelmiştir (Wollgast ve Anklam, 2000).

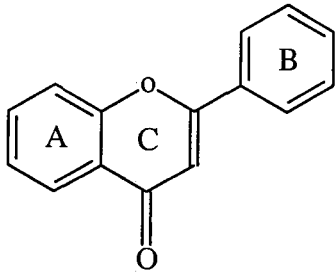
Fenolik bileşiklerin antioksidan ve antikarsinojenik etkileri, epidemiyolojik çalışmalarda, koroner kalp hastalıkları ve kansere yakalanma riski ile bu fenolik bileşikler içeren sebze ve meyve tüketimi arasındaki korelasyon gösterilmiş (Cadenas ve Packer, 2002), biyolojik ve biyokimyasal verilerle desteklenmiştir (Servili ve ark., 2004; Gorinstein ve ark., 2004a; Abdel-Wahab ve ark., 2003; Skerget ve ark., 2005).

Fenolik bileşikler 2 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Ho, 1991).

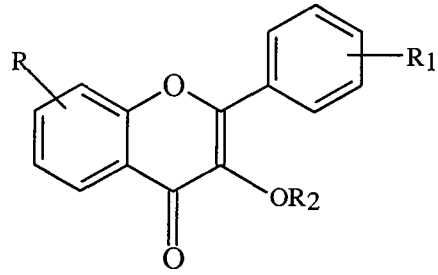
i) Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerden elde edilen fenolik bileşiklerin en geniş ve en yaygın grubunu oluşturan fenolik yapılu bileşiklerdir. Bitkilerde 4000'in üzerinde flavonoid yapılu bileşik bulunduğu tespit edilmiştir. Flavon yapısından türevlenmiş bu heterosiklik bileşikler oksidasyon durumları ve substütisyon özellikleri farklı flavonoller, flavanoller, flavononlar, flavanlar ve kateşinlerden oluşan çok büyük bir sınıftır. Başta pekçok meyve (turuçgiller, elma gibi) ve

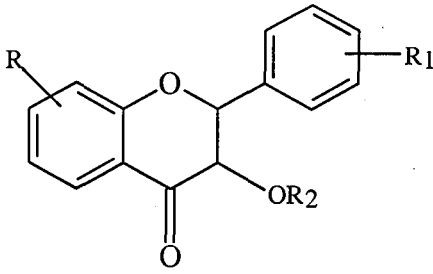
sebze olmak üzere kırmızı şarap ve soyada yüksek oranda flavonoid yapıları bulunmaktadır (Zand ve ark., 2002).



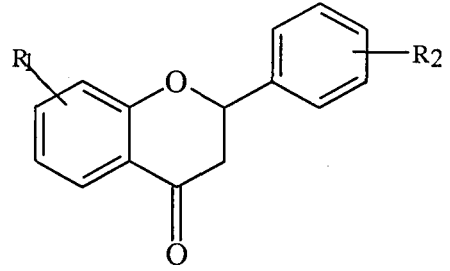
Flavon



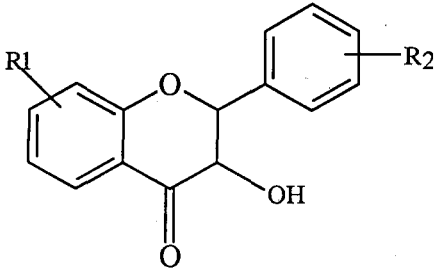
Flavonol



Flavanol



Flavonon



Katesin

Flavonoidler kimyasal olarak elektron verici özellik göstermektedir. A ve B halkalarının hidroksilasyon ve alkoksilasyon şekilleri çok fazla farklılık göstermekte ve bu özellikleri antioksidan madde olarak değerlendirilmelerine neden olmaktadır. Özellikle C halkasında 3 nolu karbondaki -OH grubu antioksidan etki açısından çok önemlidir. Süperoksit, singlet oksijen, lipid peroksit radikaller ve/veya oksidatif süreçlerde rol alan serbest radikalleri süpürmektedirler. Bu süreçler sırasında flavanoidler serbest radikal haline

dönüşürler. Ancak, konjuge yapıları orbitalde kalan elektronun kısmen inaktif olmasını sağlamaktadır (Larson, 1997).

Antioksidan aktiviteleri taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu ile ilgidir. LDL oksidasyonunun inhibisyonunu sağlamaktadırlar. Antioksidatif etkileri sadece indirgeme kapasitelerine bağlı olmayıp, protein bağlama özellikleri ile de ilişkilidir. LDL üzerinde, oksidasyona uğrayacak bölgenin yapısına uygunluğu sayesinde oksidatif atağı bloke etmekte ve LDL oksidasyonunu önlemektedirler (Aviram ve Fuhrman, 1998; Birt ve ark., 2001).

Antioksidan etkileri olduğu gibi pro-oksidan özellik taşıdıkları da bildirilmiştir (Galati ve O'Brien, 2004).

ii) Fenolik asitler

Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan fenolik asitler bitkilerdeki sekonder metabolitlerdir. Genellikle glikozitlerin ya da organik asitlerin esterleri halinde ve bitkide proteinlere veya hücre duvarı polimerlerine bağlı olarak bulunmaktadır. Sadece küçük bir grubu doğada serbest olarak bulunmaktadır. Bu tip bileşiklerin gıdalarda bulunması besinlerin stabilitesini , rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini belirgin olarak etkilemektedir (Robbins, 2003).

Fenolik asit içeren pekçok bitki damar, viral, gastrointestinal ve mikrobiyal hastalıklar ve inflamasyonlu hastalıklar da tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Robbins, 2003). Üzüm kabuk ve çekirdekleri (Yılmaz ve Toledo, 2004), buğday kepeği (Yu ve Zhou, 2005; Ferguson ve Haris, 1999), greyfurt (Gorinstein ve ark., 2004b), adaçayı (*Salvia* ssp.) (Bozan ve ark., 2002), *Sideritis* (Tunalier ve ark., 2004) gibi bitkiler ve tarçın, kimyon, sumak, karabiber gibi baharatlar (Bozan ve ark., 2003), ayrıca şarap (Minussi ve ark., 2003), zeytinyağı (Servili ve ark., 2004; Owen ve ark., 2000) gibi bitkisel ürünlerin antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiş ve bu etkilerin içerdikleri fenolik asitlerden kaynaklandığı tesbit edilmiştir (Minussi ve ark., 2003; Servili ve ark., 2004; Owen ve ark., 2000; Gorinstein ve ark., 2004a; Yu ve Zhou, 2005; Ferguson ve Haris, 1999).

Fenolik asitler temel olarak, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevlerinden oluşmaktadır (Ho, 1991).

p-OH benzoik asit, prokateşik asit, vanilik asit, gallik asit, salisilik asit sirinjik asit ve ellajik asitler hidroksibenzoik; kafeik asit, *o*-kumarik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve *tr*-sinnamik asit hidroksisinnamik asit türevleridir (Cadenas ve Packer, 2002; Lodovici ve ark., 2001; Minussi ve ark., 2003).

Yapılan çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında, hidroksisinnamik asit türevlerinin hidroksibenzoik asit türevlerine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Marinova ve Yanishlieva, 2003).

Fenolik asitler antioksidan aktivitelerini, hidrojen atomlarını vererek (Sousa ve ark., 2004) hidroksil, singlet oksijen, peroksil, peroksinitrit radikallerini süpürerek veya geçiş metalleriyle şelat oluşturarak gerçekleştirmektedirler (Cadenas ve Packer, 2002; Lodovici ve ark., 2001; Sroka ve Cisowski, 2003; Javanmardi ve ark., 2003).

Fenolik asitlerin lipid peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir. Direkt olarak LDL oksidasyonunu ve agregasyonunu inhibe etmektedirler. Ayrıca arteriyel duvarda birikip arteriyel makrofajlarda NADPH oksidazın aktivasyonunu inhibe ederek makrofaj lipid peroksidasyonunun da önüne geçmektedirler (Cadenas ve Packer, 2002; Hughes ve ark., 1991; Vieira ve ark., 1998).

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri yapılarıyla ilgilidir (Tapiero ve ark., 2002). Etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma yerine ve karşılıklı pozisyonlarına bağlıdır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Sroka ve Cisowski, 2003; Peyrat-Maillard ve ark., 2000).

Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, gallik asit, salisilik asit, *p*-OH benzoik asit, prokateşik asit ve vanilik asit' in β -karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktiviteleri ve DPPH radikali üzerinden radikal süpürücü aktiviteleri test edilmiş, -OH grubunun sayısının artmasıyla etkinin arttığı gözlenmiştir (Peyrat-Maillard ve ark., 2000; Fukumoto ve Mazza, 2000). Metoksil grubu taşıyan fenolik asit türevinin, taşımayan türeve göre daha etkili olduğu tesbit edilmiştir (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Fukumoto ve Mazza, 2000).

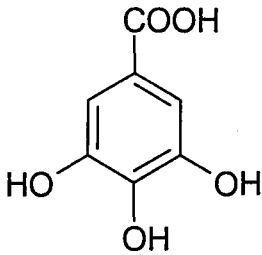
Ayrıca hidroksil gruplarının birbirine *orto*-pozisyonundan bağlı olması etki açısından avantaj olarak görülmektedir (Sroka ve Cisowski, 2003).

Fenolik asitlerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra pro-oksidan özellikleri de bildirilmiştir (Labieniec ve ark., 2003; Kerry ve Abbey, 1997; Skerget ve ark., 2005; Fukumoto ve Mazza, 2000). HPLC methodu ile; linoleik asit emülsiyonuna bakır ilave edilerek ortam oksitlenmiş, malonaldehit yüzdeleri ölçülerek kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, gallik asit, salisilik asit, *p*-OH-benzoik asit, prokateşik asit ve vanilik asit' in düşük konsantrasyonlarda pro-oksidan etki gösterdiği ispatlanmıştır. BHT ve BHA'da sözkonusu etkiye rastlanmamıştır (Fukumoto ve Mazza, 2000).

0,5 µM kafeik asitin oksidasyonu başlama safhasında inhibe ettiği, 0,1 µM kafeik asitin bakır aracılıklı oluşan LDL oksidasyonunu yayılma safhasında arttırdığı ve bu pro-oksidan aktiviteyi hidroksil radikalının oluşumunu stimüle ederek sağladığı tesbit edilmiştir (Yamanaka ve ark., 1997).

a) Hidroksibenzoik asit Türevleri

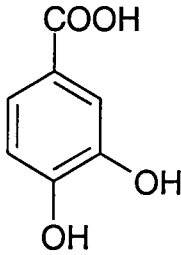
1) Gallik asit (3,4,5-trihidroksi benzoik asit)



Çok güçlü bir antioksidandır. DPPH radikal süpürücü aktivite tayiniyle fenolik asitler arasında en güçlü etki gallik asitte gözlenmiştir (Sroka ve Cisowski, 2003). Propil gallat gıda ve diğer hazır ürünlerde antioksidan olarak kullanılan sentetik gallik asit türevidir (Larson, 1997; Labieniec ve ark., 2003). Çilek, üzüm (Cadenas ve Packer, 2002), soya fasulyesi (Moran ve ark., 1997), mazi, kestane ağaç kabuğu (Ephraim ve ark., 2005) gibi bitki ve ağaçlarda oldukça yaygın bulunur. En önemli gallik asit kaynağı yeşil çaydır. Apoptozu arttırarak hayvan

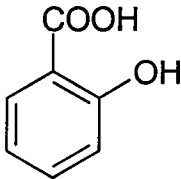
tümör hücreleri öldürme yeteneğinin (Lodovici ve ark., 2001) yanı sıra DNA' da oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir. Yüksek miktarlarda alındığı zaman toksik etki göstermektedir (Labieniec ve ark., 2003).

II) Protokateşik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit)



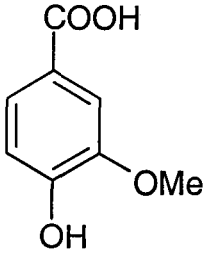
Soya fasulyesi (Moran ve ark., 1997) ve kekikte (*Origanum vulgare*) (Skerget ve ark., 2005) bulunmaktadır. Lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği fakat DPPH radikali süpürücü etkisinin zayıf olduğu gösterilmiştir (Sroka ve Cisowski, 2003).

III) Salisilik asit (2-hidroksi benzoik asit)



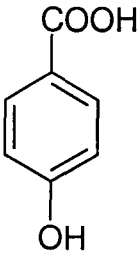
Yapısında tek hidroksil grubu taşıması nedeniyle düşük antioksidan aktiviteye sahiptir (Sroka ve Cisowski, 2003). Huş ağacı kabuğu ve kışın yapraklarını dökmeyen ağaçların yapraklarında bulunmaktadır (Windholz, 1983). Antiseptik etkilidir ve kullanılmaktadır (Kayaalp, 2000).

IV) Vanillik asit (3-metoksi 4-hidroksi benzoik asit)



Şarap (Minussi ve ark., 2003), buğday kepeği (Yu ve Zhou, 2005) ve ökaliptusta (*Eucalyptus globulus*) (González ve ark., 2004) bulunmaktadır.

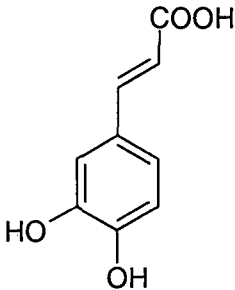
V) *p*-hidroksibenzoik asit (4-hidroksi benzoik asit)



Eucalyptus globulus' da bulunmaktadır (González ve ark., 2004)

b) Hidroksisinnamik asit Türevleri

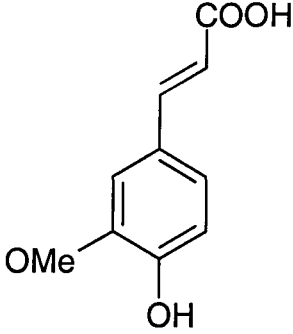
I) Kafeik asit (3,4-hidroksi sinnamik asit)



Hidroksisinnamik asitlerin doğada en sık rastlanan türevidir (Tapiero ve ark., 2002). Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde mevcuttur. Nitrite hızlı bir şekilde etki ederek nitrik oksite indirgemektedir (Huang ve Ferraro, 1991; Packer ve ark., 1999). İlk olarak 1976'da invitro sıçan beyin homojenatında lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Cadenas ve Packer, 2002).

Daha sonra kafeik asit içeren bitkilerin ekstrelerinde yapılan çalışmalarda, antioksidan aktivite ve serbest radikal süpürücü etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Servili ve ark., 2004; Sroka ve Cisowski, 2003; Yu ve Zhou, 2005).

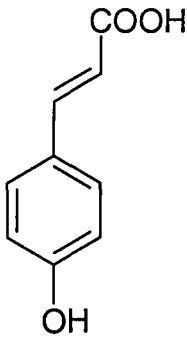
II) Ferulik asit (3-hidroksi 4-metoksi sinnamik asit)



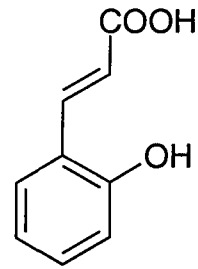
Portakal ve greyfurt potansiyel ferulik asit kaynağıdır (Naim ve ark., 1991). Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde de mevcuttur (Huang ve Ferraro, 1991). Genellikle hücre duvarının yapısında karbonhidratlarla ester halinde bulunmaktadır (Larson, 1997).

III) *p*-Kumarik asit (3-hidroksisinnamik asit)

o-Kumarik asit (2-hidroksisinnamik asit)



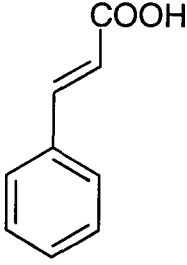
p-Kumarik asit



o-Kumarik asit

Portakal (Sousa ve ark., 2004), kiraz (Cadenas ve Packer, 2002), kahve, çikolata ve şarapta (Abdel-Wahab ve ark., 2003) bulunmaktadırlar. *p*-kumarik asitin, kardiyotoksik etkili antikanser-antibiyotik doksorubisin'in neden olduğu oksidatif strese karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (Abdel-Wahab ve ark., 2003).

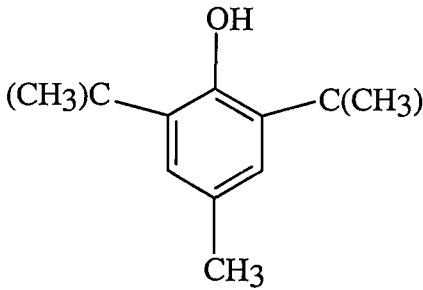
IV) *tr*-sinnamik asit



Aldoz redüktaz inhibisyonu sonucu glukozun sorbitole dönüşmesini engelleyerek çeşitli diyabetik komplikasyonları engellediği ileri sürülmektedir (Garrote ve ark., 2004). Sığala yağı, peru ve tolu balsamları, tarçın ve koka yapraklarından elde edilen yağda bulunmaktadır (Windholz, 1983)

2.2.2.22. Sentetik antioksidanlar

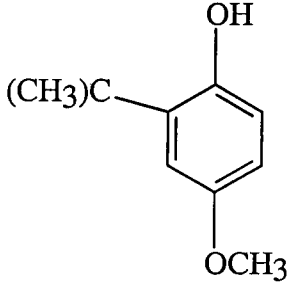
i) BHT (Bütillenmiş hidroksi toluol)



Fenolik antioksidanların sentetik olarak geliştirilmiş alternatiflerindedir (Ho, 1991). Ucuz olması, kararlı yapıda olmaları açısından en sık kullanılan sentetik antioksidanlardandır. Monohidrik bir fenolik antioksidandır. Yiyecek endüstrisinde kullanılmadan önce petrol ürünlerini oksidatif zamklaşmadan korumak için kullanılmaktaydı (Shahidi ve Nacz, 1995). Yağda ve alkolde çözünen, suda çözünmeyen beyaz renkli ve kristal yapıda bir maddedir. BHT bitkisel yağlardan çok hayvansal yağlarda oksidasyonu önleme özelliğine sahiptir.

BHT' nin akciğerde oluşmuş olan tümörü geliştirdiği gösterilmiştir. Bu tarz karsinogenik aktivitelerinin olduğunu düşündüren çalışmalardan sonra kullanımına kısıtlamalar getirilmiştir (Huang ve Ferraro, 1991).

ii) BHA (bütilenmiş hidroksianisol)



Hayvansal ve bitkisel yağlarda çözünen, suda çözünmeyen monohidrik fenolik antioksidandır. Beyaz zatkımsı tabakalar halindedir. BHT gibi yiyecek endüstrisinde kullanılmadan önce petrol ürünlerini oksidatif zatklaşmadan korumak için kullanılmaktaydı. Günümüzde özellikle uçucu yağların rengini ve kokusunu korumak için kullanılmakta ve bu özelliği nedeniyle pekçok besin maddesine ilavesine izin verilmektedir. BHA kısmen kısa zincirli yağ asitlerinin (hindistan cevizi ve hurma çekirdeği yağlarında bulunan) oksidasyonunu kontrol altına almak için kullanılır (Shahidi ve Naczki, 1995). Bazı durumlarda tersiyer butil grubunun, fenolik hidroksil üzerinde koruma meydana getirdiği ileri sürülmektedir. Bu durum, molekülü dış reaksiyonlardan korumakta ve daha az uçucu ve daha çok yağda çözünür bir forma dönüştürmektedir. BHA'nın 1983 yılında karsinogenik aktivitesi bildirilmiştir. Fare, sıçan ve hamsterların midelerinde kanser oluşumuna neden olmuş fakat köpeklerde böyle bir aktivite gözlenmemiştir (Ho, 1991).

BHA ve BHT nin uçucu özellikleri nedeniyle paketlenmiş besin maddelerine ilaveleri tercih edilir , çünkü bir süre sonra ortamdan uzaklaşırlar. Besinlere ya direk olarak ya da emülsiyon halinde ilave edilirler. İkisi birlikte kombine halde ilave edilirlerse sinerjik etki gösterdikleri tesbit edilmiştir. Fındık ve ürünlerinin oksidatif reaksiyonunu BHT ve BHA kombinasyonları engeller (Shahidi ve Naczki, 1995).

iii) Galatlar

Gallatlar; gallik asitin propanol esteridir. Fenolik bileşiklerdeki gibi antioksidan aktivitelerinde hidroksil grupları önemli rol oynamaktadır. Oktil gallat ($C_{10}H_{22}O_5$) ve dodesil gallat ($C_{19}H_{30}O_5$) katı ve sıvı yağlarda yüksek çözünürlüğe sahip iken, propil gallat ($C_{10}H_{12}O_5$) suda daha iyi çözünmektedir. Dodesil esteri en iyi, propil gallat en zayıf antioksidan etkiye sahiptir (Fujita ve Kubo, 2002).

Beyaz kristalize bir toz olan propil gallat hayvansal ve bitkisel yağların korunmasında kullanılmaktadır. Kaynama noktası $148^{\circ}C$ olan PG ısıtma sırasında etkisini kaybeder bu nedenle kızartılarak ($190^{\circ}C$ de) saklanan besin maddeleri için uygun değildir.

iv) TBHQ (tersiyer butil hidrokinon, $C_{10}H_{14}O_2$)

Karakteristik kokusu olan bir maddedir. TBHQ'un bitkisel yağlardaki antioksidan aktivitesi diğer antioksidanlardan daha fazladır. Gallatlardan farklı olarak ortamda demir varlığında renk bozulmasına neden olmaması ayrıca, BHT ve BHA' dan daha az uçucu, yüksek sıcaklığa daha dayanıklı ve etkisini katıldığı üründe daha fazla göstermesi TBHQ için avantaj olarak görülmektedir (Khan ve Shahidi, 2001; Shahidi ve Naczki, 2004).

2.2.2. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

2.2.2.1. Lipid peroksidasyonu inhibisyonuna dayalı yöntemler

i) Peroksit sayısı

Peroksit sayısını ölçmek için en çok başvurulan yöntem iyodometrik titrasyon yöntemidir. Asetik asitteki potasyum iyodürden serbest hale geçen iyodun tiyosülfat ile titrasyonu sonucu peroksit içeriği değerlendirilmektedir (Frankel ve Meyer, 2001).

ii) Schaal fırın testi

Bu testte ısıya karşı oksidatif kararlılık ölçülmektedir. Kişisel koku ve tat duyusuna göre karar verilmektedir (Frankel ve Meyer, 2001).

iii) Tiyobarbütirik asit testi(TBARS)

TBA yöntemi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan monoaldehitlerin (MDA), glasiyel asetik asit ve 2-tiyobarbütirik asitle ısıtılması sonucu verdikleri kırmızı rengin şiddetinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Şu anda en çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Kullanılan örneklerin lipoprotein fraksiyonlarının asit ile çöktürülmesi reaksiyonun spesifikliğini artırmaktadır. Kullanılacak örnekler -80°C 'de 1-2 ay saklanabilir (Anonim, 2005e; Callaway, 1998).

MDA için HPLC analizleri de mevcuttur. Bu teknik daha fazla zaman alıcı, fakat daha spesifiktir. C_{18} kolon ve asetonitril veya metanol gibi mobil fazlar analiz için uygundur (Anonim, 2005e).

iv) β -karoten-linoleik asid sistemi

Bu yöntemde, antioksidan aktivite linoleik asit sisteminde β -karotenin oksidasyonu ölçülerek tayin edilmektedir (Vaya, 1997). Reaksiyon sonunda çözeltide β -karotenin kaybolan karakteristik sarı renginin absorbansı 470 nm'de UV-Spektrofotometre'de kaydedilerek, sonuçlar standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlar ile karşılaştırılarak verilmektedir (Martinez, 2001; Leja, 2001; Wettasinghe ve Shahidi, 1997). Reaksiyon genellikle 50°C civarında başlar, basit,duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (González ve ark., 2004; Fukumoto ve Mazza, 2000).

v) Ransimat yöntemi

Çeşitli antioksidanların antioksidatif potansiyellerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Kullanılan sabit yağın acılaşması sonucu oluşan lipid oksidasyon ürünü küçük moleküllerin elektrik geçirgenliğindeki artışı ölçmeye dayanan Ransimat cihazı ile gerçekleştirilmektedir (Shahidi ve Naczki, 2004; Chen ve Ho, 1997)

2.2.2.2. Serbest radikal süpürücü etki tayin yöntemleri

i) DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü Etki

DPPH, kararlı bir radikaldır ve bir elektron veya hidrojen kabul eder. Antioksidanların, DPPH radikaline bir hidrojen atomu verme yetenekleri üzerinden süpürücü etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bu yöntem ile antioksidanların stabil DPPH radikalini indirgenmiş DPPH (DPPH-H) formuna getirme yeteneği değerlendirilir.



Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kısa zamanda sonuç veren bir yöntemdir (Sanchez-Moreno ve ark., 1998; 1999).

ii) TRAP (total radikal-trapping parameter)

Plazma ve serum' un toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilmiştir. 2,2-azobis (2-amidinopropan) hidroklor (ABAP) , antioksidanları oksitlemek için peroksil radikallerini üretmektedir. İndüksiyon süresi standart olarak kullanılan Troloks'unki ile karşılaştırılmaktadır. Oksidasyon olayı oksijen absorpsiyonu ile gözlenebilmektedir (Frankel ve Meyer, 2000; Sandoval ve ark., 2002).

iii) Total Antioksidan Kapasite (TEAC) Ölçümü

Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) denen bu yöntemle total antioksidan kapasite ölçülebilmektedir. Bu amaçla, vitamin E, β-karoten, flavinoidler, GSH, urat, bilirübin, transferrin, seruloplazmin, albümin, GPx, Se, SOD, katalaz seviyeleri değerlendirilmektedir. Yöntemin temeli; radikallerin ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sulfonik asit) ile reaksiyon vermesine dayanır.

Oksijen radikali absorblama yeteneği de aynı TEAC'nin tespiti için kullanılır, fakat burada floresans ölçümü yapılmaktadır (Anonim, 2005e).

iv) Süperoksit anyon süpürücü aktivite testi (FRAP)

Antioksidanların elektron yoklama kapasitesi ile doğru orantılı olan demir indirgeme gücünü doğrudan antioksidanın demir-III-tripidil-triazine kompleksini (Fe^{+3} -TPTZ), demir-II-kompleksine (Fe^{+2} -TPTZ) indirgeyebilme yeteneğiyle ölçmektedir (Frankel ve Meyer, 2001).

v) Elektron Paramagnetik Rezonans Spektroskopisi (EPR)

Bu tekniğe, Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi de (ESR) denilir. Bu yöntem en çok kullanılan doğrudan radikal ölçüm yöntemidir. Radikallerin bünyesinde bulunan magnetik enerji seviyesinin dışarıdan uygulanan bir magnetik alanla iki farklı enerji seviyesine ayrılma olayı üzerine kurulmuştur. Yöntemin dezavantajı birkaç saniye gibi kısa ömürlü radikallerin ölçüm işleminin zor olmasıdır ve bu yüzden sadece uzun ömürlü radikaller doğrudan analiz edilebilmektedir. Bu dezavantajı yenmek için kısa ömürlü radikaller spin tuzağı denilen nitrozo veya nitron içeren bileşiklerle reaksiyona sokulup uzun ömürlü türevler oluşturulur ve analiz ancak bu şekilde mümkün hale gelebilmektedir (Rice-Evans ve ark., 1991, Anonim, 2005e).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.1. Materyal

3.1.2. Kimyasal madde ve çözeltiler

Gallik asit, protokateşik asit, *p*-OH-benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit ferulik asit, *o*-kumarik asit, *trans*-sinnamik asit, β -karoten, BHT (butillenmişhidroksi toluol), BHA (butillenmişhidroksi anizol), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma- Aldrich), salisilik asit, *p*-kumarik asit, linoleik asit (Fluka), Tween 80, metanol, kloroform (Merck). Ham zeytin yağı Üstün Zeytincilik, Balıkesir firmasından alınmıştır

3.1.3. Kullanılan cihazlar

UV- visible Spektrofotometre (Shimadzu 160A), Ransimat Cihazı (743 Metrohm AG, İsviçre), Eliza mikropalak okuyucu (Bio.Tek. EL_x808_{IU}), Ultrasonik banyo (1 L, J.P. Selecta), Etüv (Venticell-55) Hassas Terazi (Shimadzu-AEX 200G), Rotavapor (Buchi-R114), Vortex karıştırıcı (Nuvemix- NM110vibratör)

3.1.4. Kullanılan malzemeler

6 ml borosilikat vial (Cole Parmer), Spektrofotometre kuveti (S-10SM 1 ml Quartz), 96 kuyucuklu mikropalaka (Corning), Otomatik Pipetör (100 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L, Eppendorf), Steril otomatik mikropipet ucu (100 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L, Eppendorf), beher (250 ml, İldam), armudi balon (50 ml. İldam) Pyrex-cam tüp (10 ml, 16x100 mm, İldam), Kapaklı cam tüp (10 ml ,İldam), balon joje (10 ml, 25 ml, 100 ml, 250 ml, İldam).

3.2. Yöntem

3.2.1. DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki

Test edilen fenolik asitler ve kombinasyonlarından hazırlanan çözeltilerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri

Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir.

Metanol içerisinde hazırlanmış 0.1, 0.2 ve 0.4 ml örnek çözeltileri (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonları 9.6×10^{-4} - 3.5×10^{-3} mg/ml) üzerine metanolde hazırlanmış 3 ml DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek vortexde 30 sn karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm de absorbands değerleri okunmuştur. 4.0×10^{-3} ve 2.0×10^{-2} g/L konsantrasyon aralığında DPPH standartı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (g/L) hesaplanmıştır.

$$A_{517nm} = 26,21(\text{DPPH})_t + 2,2 \times 10^{-3} \quad (r = 0.9998)$$

30 dakika sonucunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{kalan}} = (\text{DPPH})_{t=30} / (\text{DPPH})_{t=0} \times 100$$

Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, referans madde olarak BHT ve BHA kullanılmıştır.

3.2.2. β -karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini

Bu yöntem, β -karoten ve linoleik asit sulu emülsiyon sisteminde ısı yardımıyla oksidasyonunun indüklenmesi esasına dayanan antioksidan tayin yöntemidir (Burda ve Oleszek, 2001).

Kuru bir kaba tartılan 40 mg linoleik asit ve 400 mg Tween 80 ile β -karoten çözeltisinin tamamı (3mg/ml kloroformda) vorteksde iyice karıştırılmış, kloroform alçak basınç altında 40°C de rotavaporda ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakiye su ile emülsifiye edilerek 100 ml ye tamamlanmıştır. Portakal renkli bu stok çözelti deneyler sırasında karanlıkta saklanmıştır. 3 ml β -karoten çözeltisi içerisine 0.2 ml numune çözeltisi (0.6 mg/ml konsantrasyonda) ilave edilerek vorteksde iyice karıştırılmış, herbir numune çözeltisi (0.2 ml) mikropklara yerleştirilerek işlem sırasında 40°C de etüvde tutulmuş ve 15 dakika aralıklarla 490 nm de ELİZA mikropklak okuyucuda absorbandsları ölçülmüştür. Herbir deney 3 kez tekrarlanmış, sonuçlar zamana (dakika) karşı okunan absorbands değerleri

grafığe geçirilerek ve ayrıca antioksidan aktivite fenolik asit ilave edilmeksizin kontrole karşı oksidasyonun inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve sentetik antioksidanlar BHT ve BHA'nın sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak metanol kullanılmıştır.

$$\% \text{ Antioksidan aktivite} = 100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{180}) / (A_k^0 - A_k^{180})]$$

A_s^0 = örneğin başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

A_s^{180} = örneğin 180 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

A_k^0 = kontrolün başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

A_k^{180} = kontrolün 180 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

3.2.3. Ransimat yöntemi ile Lipid oksidasyonunu inhibe edici etki

Ransimat yöntemi çeşitli antioksidanların antioksidatif potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktiviteleri yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek suyun iletkenliğinin değişmesi prensibine göre çalışan Ransimat cihazı ile test edilmiştir (Chen ve Ho, 1997).

Bu testte linoleik asitçe zengin (%60-65) ham zeytin yağı kullanılmıştır.

3 g yağ içine %0.02 ve 0.1 olacak şekilde numune veya standart madde (BHT veya BHA) ilave edilerek yağ içerisinde dağılması sağlanmıştır. 100 °C de, 20 L/saat hava akışına maruz bırakılan numunelerin bozunma zamanları ölçülmüş ve antioksidan aktiviteleri (Bozunma İndisleri) hesaplanmıştır. Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır.

$$\text{Bozunma İndisi (I.I.)} = I_{\text{numune}} / I_{\text{kontrol}}$$

Formüle göre; örneklerin Bozunma İndisleri kontrol ile karşılaştırılarak antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir.

4. BULGULAR

Tez kapsamında bitkiler aleminin hemen hemen tüm fertlerinin kimyasal yapısında çeşitli oranlarda bulunarak bitkilere renk, koku ve tat veren fenolik asitlerden bazıları ile, bu fenolik asitlerin bitkilerde kombine halde buldukları göz önüne alınarak, bunların farklı kombinasyonlarının DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini kullanılarak anti-radikal aktiviteleri ve β -karoten linoleik asit sistemi ve Ransimat yöntemi ile antioksidan aktiviteleri ve değerlendirilmiştir.

4.1. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Genel olarak, kimyasal maddelerin elektron verme yetenekleri lipid oksidasyona karşı gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin sonucudur. DPPH serbest radikal süpürücü etki tayini; hidrojen verme potansiyelinin araştırılması için en kısa yöntemlerden birisidir (Kikuzaki ve ark., 2002).

Fenolik asitler ve kombinasyonlarından hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin anti-radikal aktiviteleri DPPH^{*} (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali üzerinden Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar test edilen konsantrasyonlarda % inhibisyon olarak değerlendirilmiş ve sentetik antioksidanlar BHA ve BHT'nin değerleriyle karşılaştırılmıştır. Örneklerin serbest radikal süpürücü etkileri Tablo 1. de verilmiştir.

DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayininde; test edilen madde konsantrasyonu ile antioksidan aktivitenin doğru orantılı olduğu görülmektedir.

Tablo 1. Fenolik asitler ve kombinasyonlarının 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri (% inhibisyon)

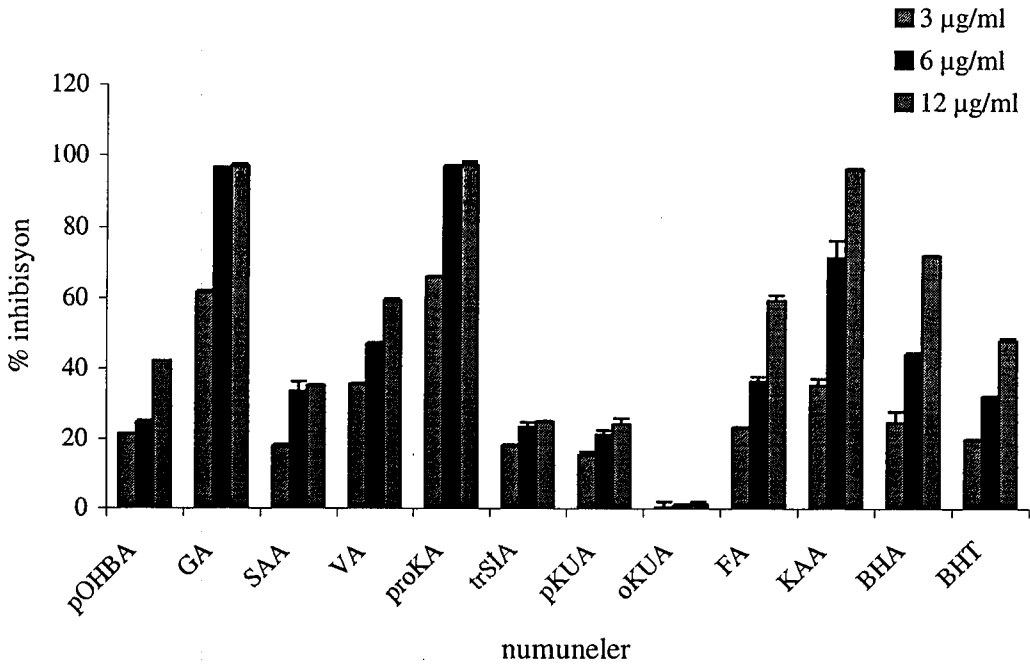
Fenolik asitler ve kombinasyonları	% İnhibisyon*		
	3 µg/ml	6 µg/ml	12 µg/ml
POHBA	21,44±0,5	24,57±0,6	42,32±0,62
GA	61,73±0,5	96,83±0	97,18±0,3
SAA	17,96±0,2	33,73±2,8	35,32±0,4
VA	35,72±0,27	47,29±0,38	59,51±0,85
proKA	66,15±0,44	97,01±0,53	97,67±0,19
<i>tr</i> SİA	18±0,87	23,6±1,3	25±1,6
<i>p</i> KUA	15,4±1,85	21,3±1,3	24,3±0,7
<i>o</i> KUA	0,29±0,3	0,8±0,59	1,37±1,49
FA	23,27±1,86	36,74±1,18	59,6±0,29
KAA	35,6±3,11	71,7±4,8	96,6±0,22
<i>p</i>OHBA +GA	20,35±0,51	44,15±0,64	91,72±0,31
<i>p</i> OHBA +SAA	10,23±0,81	8,11±0,24	34,27±1,35
<i>p</i> OHBA +VA	9,22±0,51	12,15±0,6	28,31±4,01
<i>p</i> OHBA+proKA	9,67±0,23	7,82±0,48	0,7±0,97
GA+SAA	24,19±1,03	59,14±0,83	91,63±0,78
GA+VA	31,84±0,13	61,08±1,76	96,74±0
proKA+ GA	22,02±0,37	55,72±0,13	96,74±0
SAA+VA	2,25±0,3	2,84±0,39	2,55±0,27
proKA+ SAS	13,32±0,38	24,72±0,52	42,1±0,84
proKA+ VA	18,51±0,88	34,63±0,92	64,57±0,83
<i>tr</i> SİA+ <i>p</i> KUA	4,34±0,21	7,5±0,47	5,8±0,6
<i>tr</i> SİA +SAA	5,35±0,47	6,75±0,75	7,83±0,5
<i>tr</i> SİA +FA	0,18±0,35	5,7±0,39	19,1±0,6
<i>tr</i> SİA +KAA	9,05±1,04	24,72±0,96	52,7±1,19
<i>p</i> KUA+ <i>o</i> KUA	4,58±1,65	3,9±1,13	4,15±0,22
<i>p</i> KUA +FA	6,58±0,5	14,78±0,5	30,83±1,13
<i>p</i> KUA +KAA	16,2±0,7	33,95±1	69,12±1,13
<i>o</i> KUA +FA	7,29±0,62	10,6±0,74	22,41±1,07
<i>o</i> KUA +KAA	16,5±0,3	34,03±1,06	60,5±1,22
FA+KAA	23,4±0,73	44,1±1,18	83,71±1
BHA	24,86±0,2	44,41±0,55	72,17±0,79
BHT	19,97±1,82	32,32±0,21	48,36±0,89

*Sonuçlar ortalama değer±standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

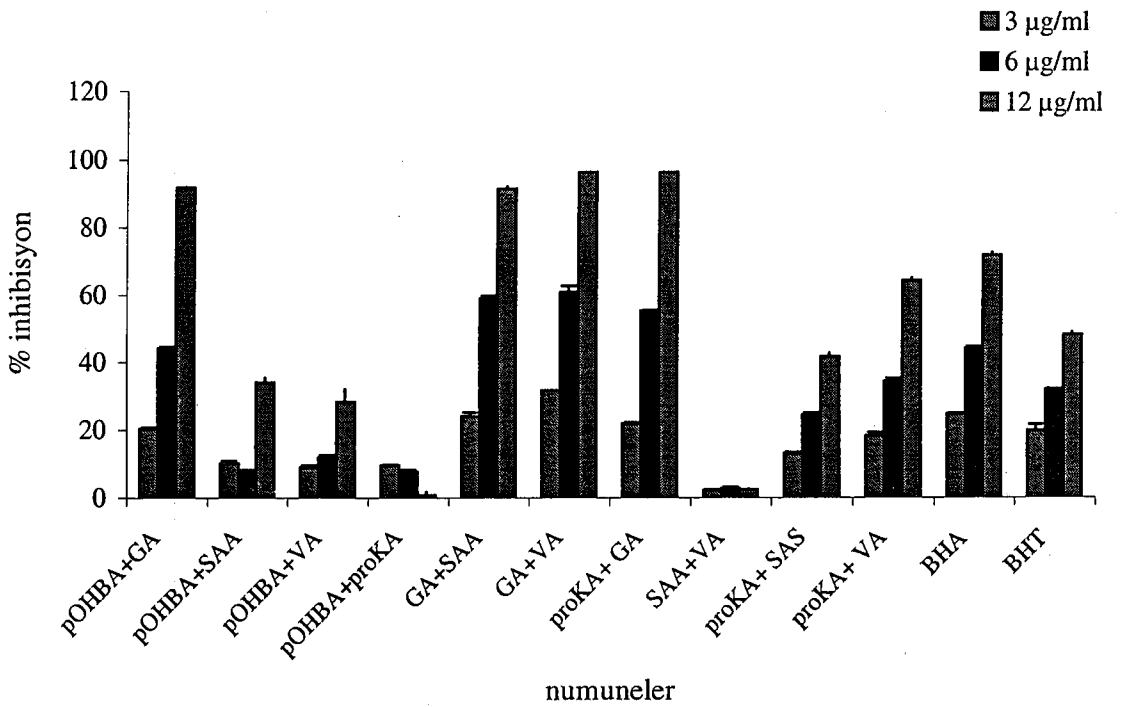
Tablo 1. ve Şekil 1.'de görüldüğü gibi fenolik asitler arasında benzoik asit türevlerinin sinnamik asit türevlerine göre serbest radikal süpürücü etki bakımından daha aktif oldukları görülmüştür. Her üç konsantrasyonda da en güçlü serbest radikal süpürücü etki gösteren maddeler gallik asit (GA) ve protokateşik asit (proKA) olduğu tesbit edilmiştir. Öyle ki GA ve proKA standart olarak kullanılan sentetik antioksidan BHT'den ~2 kat, BHA'dan ise ~0.5 kat daha aktif bulunmuştur. Ayrıca kafeik asidinde (KAA) en yüksek iki konsantrasyonda maksimum etki gösterdiği gözlenmiştir.

Serbest radikal süpürücü etki açısından diğer hidroksibenzoik asit türevleri arasındaki sıralama ise $BHA > VA > BHT > pOHBA > SAA$ şeklinde, hidroksisinnamik asit türevleri arasındaki sıralama ise $BHA > FA > BHT > trSIA > pKUA > oKUA$ şeklinde tesbit edilmiştir.

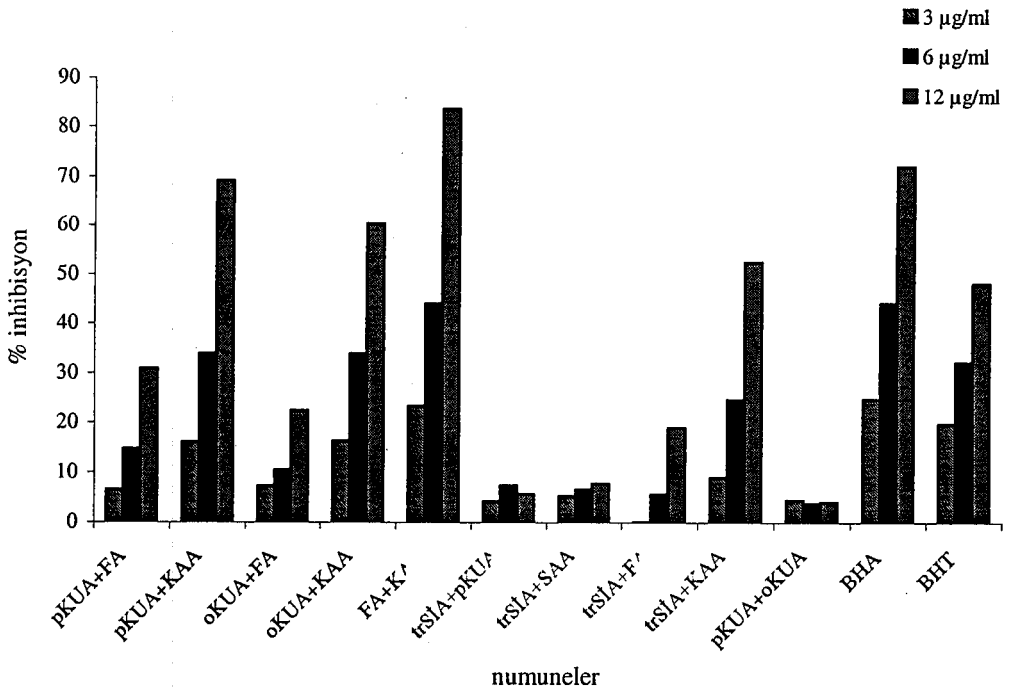
Tez kapsamında değerlendirilen fenolik asit kombinasyonlarından, aynı yalın GA de olduğu gibi, en güçlü serbest radikal süpürücü etki GA ile oluşturulan kombinasyonlarda görülmüştür (Tablo 1., Şekil 2.). GA+proKA ve GA+VA kombinasyonları başta olmak üzere GA+SAA ve GA+pOHBA de tesbit edilmiştir Yukarıda belirtilen 4 kombinasyon, standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlar BHT ve BHA'dan daha güçlü anti-radikal etki göstermişlerdir Ayrıca hidroksi sinnamik asit kombinasyonlarından FA+KAA inde BHA ve BHT den daha güçlü etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu kombinasyonları $BHA > pKUA+KAA > proKA+VA > oKUA+KAA > pKUA+oKUA > SAA+ proKA > BHT > pOHBA +proKA > trSIA+FA > pKUA+FA > oKUA+FA > SAA+VA > pOHBA +VA > trSIA+pKUA > trSIA+oKUA > pOHBA +SAA$ kombinasyonları izlemektedir (Şekil 2. ve 3.).



Şekil 1 Fenolik asitlerin 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri



Şekil 2. Hidroksibenzoik asit türevlerine ait kombinasyonların 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri



Şekil 3. Hidroksisinnamik asit türevlerine ait kombinasyonların 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri

4.2. β -karoten-Linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini

Bu yöntem, β -karoten ve linoleik asit sulu emülsiyon sisteminde ısı yardımıyla β -karoten oksidasyonunun indüklenmesi esasına dayanan antioksidan tayin yöntemidir (Burda ve Oleszek, 2001).

Antioksidan aktivite, fenolik asit ilave edilmeksizin kontrole karşı oksidasyonun inhibisyon yüzdesi olarak hesaplanmış ve sentetik antioksidanlar BHT ve BHA'nın sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Tablo 2.). Ayrıca başlangıçtan itibaren 15 dakika aralıklarla 180 dakika boyunca okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.,5.,6.).

β -karoten-linoleik asit sisteminde test süresi olan 3 saat boyunca β -karotenin solmasının önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir.

Tablo 2. Fenolik asit ve kombinasyonlarının β -karoten-linoleik asit sisteminde % Antioksidan Aktivite değerleri

Fenolik asitler ve kombinasyonları	AA (%) ¹
SAA	60,07±0.8²
POHBA	53,07± 0.04
VA	45,57±0.01
GA	36,24±0.1
ProKA	32,06±0.05
FA	58,72±0.5
KAA	43,61±0.6
PKUA	42,13±0.08
TrSİA	40,66±0.02
OKUA	39,92±0.3
pKUA+KAA	58,96±0,06
FA+KAA	49,75±0,5
oKUA+KAA	46,92±0,07
trSİA +KAA	42,99±0,09
GA+proKA	41,76±0,6
pKUA+FA	40,90±0,05
trSİA+FA	39,92±0,06
oKUA+FA	38,82±0,08
SAA+proKA	38,69±0,06
pOHBA+GA	38,08±0,6
VA+proKA	38,57±0,02
GA+VA	35,87±0,3
pOHBA +SAA	33,90±0,6
GA+SAA	32,06±0,08
pOHBA +proKA	31,57±0,05
trSİA+pKUA	31,57±0,03
pKUA+oKUA	29,48±0,05
SAA+VA	28,99±0,09
trSİA+ oKUA	28,62±0,03
pOHBA +VA	28,50±0,03
BHT	82.80±0,07
BHA	89.06±0.3
Kontrol	1.84±0.05

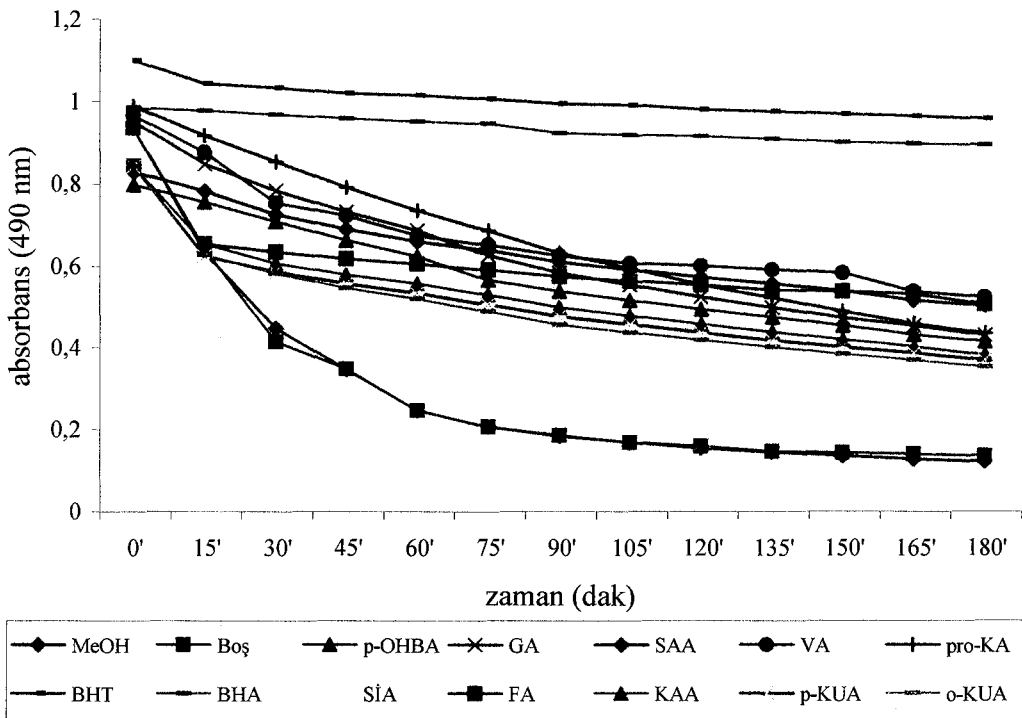
$$^1\% \text{ Antioksidan Aktivite} = 100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{180}) / (A_k^0 - A_k^{180})]$$

²Sonuçlar ortalama değer±standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

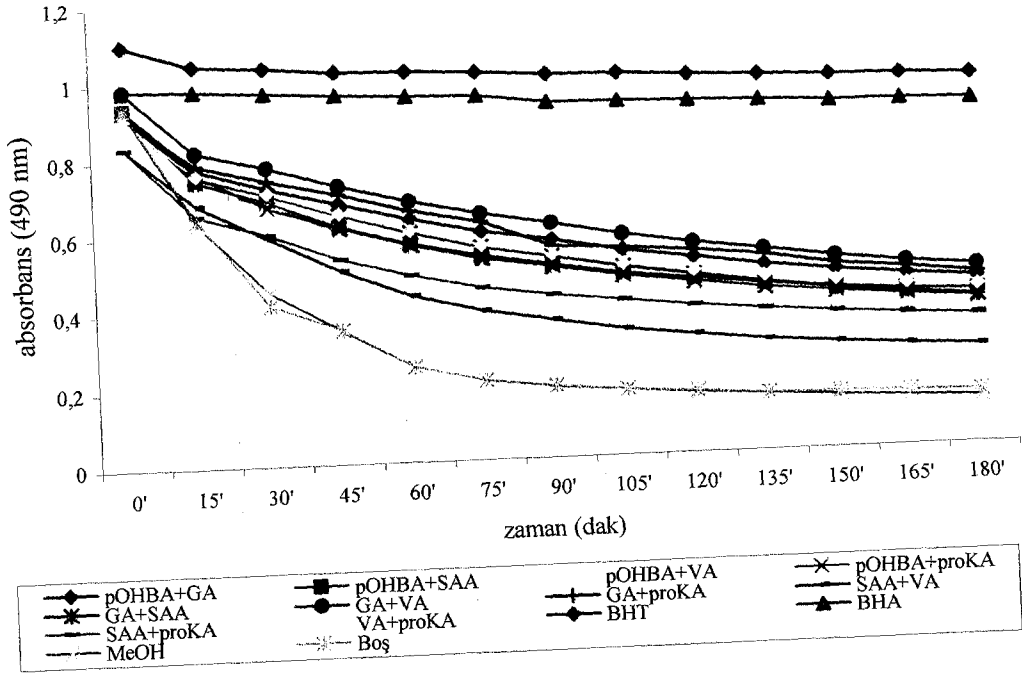
Tablo 2. de de görüldüğü gibi β -karoten-linoleik asit sisteminde hiçbir fenolik asit ve/veya fenolik asit kombinasyonunun antioksidan aktivitesi standart olarak kullanılan BHT veya BHA nın % antioksidan aktivite değerlerine ulaşamamıştır. Tablo 2. de en aktif fenolik asit SAA olarak görülmektedir. Bunun dışında, artan antioksidan aktivite değerlerine göre benzoik türevlerini **BHA > BHT > SAA > pOHBA > VA > GA > proKA**, sinnamik asit türevlerini

ise **BHA** > **BHT** > FA > KAA > *p*KUA > *tr*SİA > *o*KUA şeklinde sıralamak mümkündür.

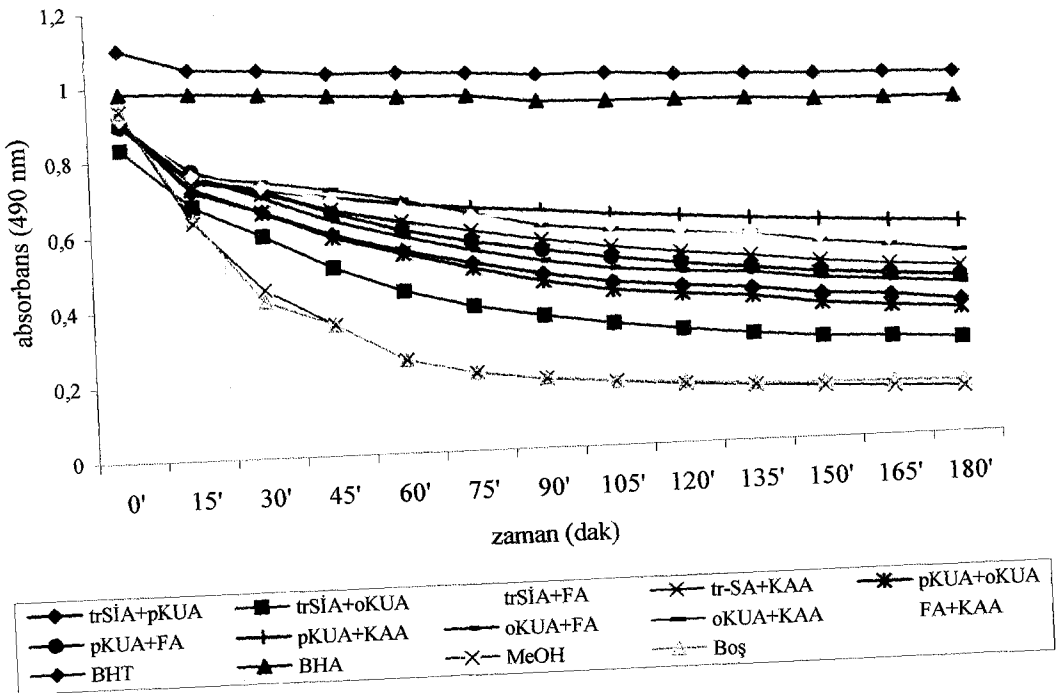
β -karoten-linoleik asit sisteminde test edilmiş fenolik asit kombinasyonlarından en aktif olan beş tanesi **BHA** > **BHT** > *p*KUA+KAA > FA+KAA > *o*KUA+KAA > *tr*SİA +KAA> GA+proKA şeklinde sıralanmıştır.



Şekil 4. β -karoten-linoleik asit sisteminde fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri



Şekil 5. β -karoten-linoleik asit sisteminde hidroksibenzoik asit kombinasyonlarının antioksidan aktiviteleri



Şekil 6. β -karoten-linoleik asit sisteminde hidroksisinnamik asit kombinasyonlarının antioksidan aktiviteleri

4.3. Ransimat Yöntemi ile Lipid oksidasyon üzerine inhibe edici etki

Ransimat yöntemi çeşitli antioksidanların antioksidatif potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktiviteleri yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek suyun iletkenliğinin değişmesi prensibine göre çalışan Ransimat cihazı ile test edilmiştir (Chen ve ark., 1997).

Ransimat yönteminde test edilen madde konsantrasyonu ile antioksidan aktivitenin doğru orantılı olduğu görülmektedir.

Ransimat yöntemi ile zeytin yağının peroksidasyonu üzerine fenolik asitlerin etkisi Şekil 7.' de, bozunma indisleri ise Tablo 3.' te gösterilmiştir. Tablo 3. ve Şekil 7.'ye göre lipid oksidasyonu en güçlü inhibe eden fenolik asit gallik asit (GA) olarak görülmektedir. Gallik asidi $KAA > proKA > BHA > FA$ izlemektedir. Adı geçen dört fenolik asit test edilen her iki konsantrasyonda da standart olarak kullanılan BHA ve BHT nin inhibisyon oranlarından daha yüksek değerlere ulaştıkları ve dolayısıyla daha güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri tesbit edilmiştir. Bunların dışında kalan fenolik asitlerin Ransimat yöntemine göre antioksidan etki güçlerini şu şekilde sıralayabiliriz: $BHT > pKUA > VA > pOHBA$.

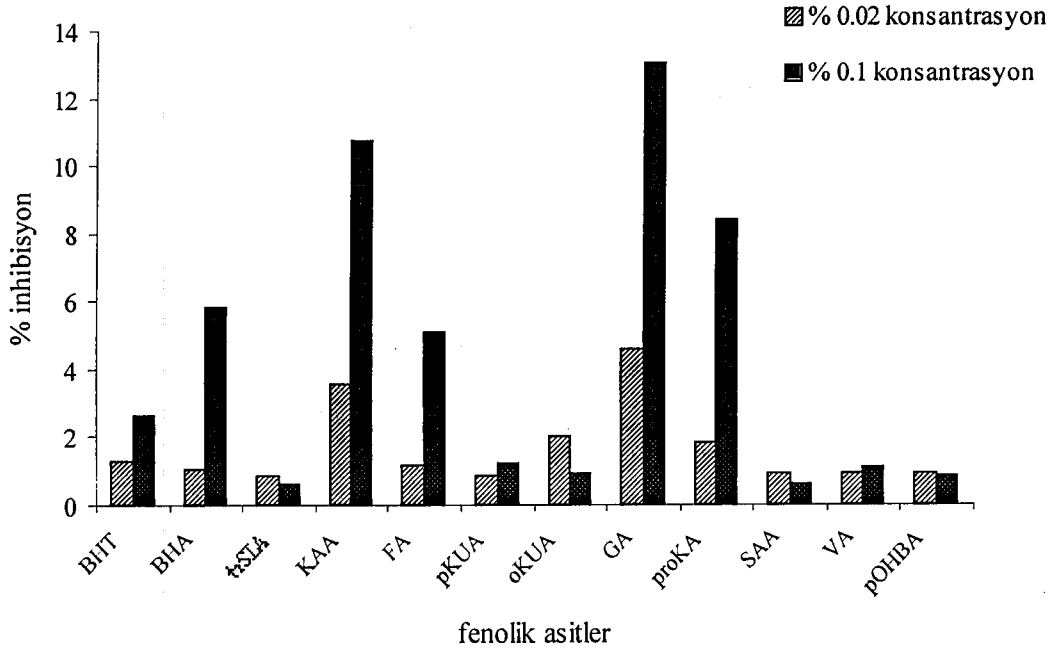
Ayrıca, yapılan bu aktivite çalışmaları sırasında; SAA, *trSIA*, *oKUA* in konsantrasyonları arttıkça inhibisyon yüzdelерinin azaldığı, bu bulgulara paralel olarak da antioksidan etkinin azaldığı görülmüştür.

Tablo 3. İki farklı konsantrasyonda zeytin yağına ilave edilen fenolik asitlerin Ransimat yöntemi ile ölçülen bozunma indisleri

Uygulama	Bozunma İndisi ^{1,2}	
	%0,02	%0,1
Zeytin yağı + <i>p</i> OHBA	0,92±0,019	0,86±0,068
Zeytin yağı +SAA	0,91±0,033	0,64±0,132
Zeytin yağı + <i>pro</i> KA	1,82±0,112	8,39±0,00001
Zeytin yağı +VA	0,94±0,076	1,11±0,036
Zeytin yağı +GA	4,59±0,127	13,06±0,0001
Zeytin yağı + <i>tr</i> SİA	0,85±0,027	0,60±0,023
Zeytin yağı +KAA	3,59±0,075	10,76±0,91
Zeytin yağı + <i>p</i> KUA	0,88±0,03	1,21±0,075
Zeytin yağı + <i>o</i> KUA	2,03±0,016	0,92±0,027
Zeytin yağı +FA	1,14±0,057	5,1±0,005
Zeytin yağı +BHA	1,02±0,028	5,83±0,140
Zeytin yağı +BHT	1,27±0,018	2,64±0,225

¹ Bozunma indisi: zeytin yağı+örnek bozulma zamanı/zeytin yağı bozunma zamanı

² Sonuçlar ortalama değer±standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.



Şekil 7. Ransimat yöntemi ile zeytin yağının peroksidasyonu üzerine fenolik asitlerin etkisi

5. TARTIŞMA

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı ve lipid oksidasyonu önleyen veya geciktiren bileşiklerdir. Besin maddelerine ilave edilen antioksidanlar acılaşmayı minimuma indirir, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engeller, besin değerlerini korur ve raf ömrünü uzatırlar. Son zamanlarda sentetik antioksidanların güvenilirliği sorgulanmaya başlandığından yerine hem in vivo olarak hem de besinlerde kullanmak için doğal antioksidan madde arayışları çığ gibi büyümektedir. Pekçok tayin yönteminde, tokoferoller, flavonoidler, kumarinler, antosiyaninler, fenolik asitler gibi bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan pekçok polifenolik bileşik antioksidan aktivite göstermektedirler. Potansiyel bir kaynak olarak bitkisel fenoller primer (chain-breaking) antioksidan aktiviteye sahiptirler. (Shahidi ve Naczki, 1995)

Fenolik asitler antioksidan aktivitelerini, hidrojen atomlarını vererek (Sousa ve ark., 2004) hidroksil, singlet oksijen, peroksil, peroksinitrit radikallerini süpürerek veya geçiş metalleriyle şelat oluşturarak gerçekleştirmektedirler (Cadenas ve Packer 2002; Lodovici ve ark, 2001; Javanmardi ve ark., 2003).

Antioksidan aktivite lipidlerin otooksidasyonunun primer ve sekonder ürünlerinin kantitatif tayini ile ya da diğer değişiklikleri izlenerek değerlendirilir.

Ransimat yöntemiyle gerçekleştirdiğimiz lipid peroksidasyon çalışmalarımızda en güçlü inhibisyonu gerçekleştiren fenolik asitin gallik asit (GA) olduğu görölmektedir (Bakınız Tablo 3.). Bununda nedeni, yapısındaki üç adet -OH molekülüdür. Çünkü fenolik asitlerin benzoik ve sinnamik asit türevlerinin hidroksil gruplarının sayısındaki artış daha yüksek antioksidan aktiviteye neden olmaktadır. Fenil halkasındaki üç -OH grubu yüksek aktivite nedenidir. Bir hidroksil grubunun kaybı aktiviteyi bir ölçüde azaltırken iki -OH kaybı aktivitede belirgin bir azalmaya neden olmaktadır. Dziedzic ve Hudson (1983) fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi için enaz iki -OH grubunun gerektiğini belirtmişlerdir.

Ransimat yöntemi ile elde edilen sonuçlarda en güçlü antioksidan olan gallik asiti $KAA > proKA > BHA > FA$ izlediği tesbit edilmiştir. Adı geçen dört fenolik asitin test edilen her iki konsantrasyonda da standart olarak kullanılan BHA ve BHT'nin inhibisyon oranlarından daha yüksek değerlere sahip olduğu, dolayısıyla daha güçlü antioksidan aktivite göstermiş olduğu tesbit edilmiştir. Bununla birlikte KAA ve proKA in yapılarında ikişer -OH grubu taşımaları ayrıca FA te de bir -OH ve bir -OCH₃ grupları taşıması olarak belirlenmiştir.

Bunların dışında kalan fenolik asitlerin Ransimat yöntemine göre antioksidan etkileri % inhibisyon oranlarına göre $BHT > pKUA > VA > pOHBA$ şeklinde sıralanmıştır.

Chen ve Ho (1997) tarafından domuz yağı kullanılarak bazı fenolik asit ve esterlerinin lipid peroksidasyonunu inhibe etme yetenekleri Ransimat yöntemi ile araştırılmış, antioksidan indeksleri KAA için 11.1, FA için 2.01, BHT 2,77 kaydedilmiştir.ve sonuçlar bulgularımızla karşılaştırıldığında (KAA için 10,76; FA için 5,1 ve BHT için 2,67) paralellik gösterdiği tesbit edilmiştir. Aynı çalışmada kafeik ve ferulik asit ile esterlerinin DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkileri değerlendirilmiş 20 µM konsantrasyonda inhibisyon oranları $KAA > FA > BHT$ olarak bulunurken, bizim bulgularımız ise 12 µM konsantrasyonda $KAA > BHA > FA > BHT$ şeklinde tesbit edilmiştir. Yine bu sonuçlarda da iki -OH grubuna sahip KAA' in bir -OH grubuna sahip FA'den daha yüksek inhibisyon yüzdesine sahip olması, fenil halkasındaki iki hidroksil grubunun antioksidan aktivite için yeterli olduğunu göstermektedir. Sanchez-Moreno ve ark. (1999) tarafından gerçekleştirilen antiradikal aktivite çalışmasında en güçlü serbest radikal süpürücü aktiviteyi GA göstermiş olup onu KAA ve BHA izlemiş, FA in ise daha düşük aktivite göstredığı belirlenmiş, bu çalışmanın sonuçları da bulgularımızı desteklemektedir.

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri yapılarıyla ilgilidir (Tapiero ve ark., 2002). Etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri yapılarıyla ilgilidir (Tapiero ve ark., 2002). Etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma yerine ve karşılıklı pozisyonlarına bağlıdır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Sroka ve Cisowski 2003; Peyrat-Maillard ve ark., 2000).

Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, gallik asit, salisilik asit, *p*-OH benzoik asit, prokateşik asit ve vanilik asit' in β -karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktiviteleri ve DPPH radikali üzerinden radikal süpürücü aktiviteleri test edilmiş, -OH grubunun sayısının artmasıyla etkinin arttığı gözlenmiştir (Peyrat-Maillard ve ark., 2000). Metoksil grubu taşıyan fenolik asit türevinin, taşımayan türeve göre daha etkili olduğu tesbit edilmiştir (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Fukumoto ve Mazza, 2000).

Ayrıca hidroksil gruplarının birbirine *orto*-pozisyonundan bağlı olması etki açısından avantaj olarak görülmektedir (Sroka ve Cisowski, 2003).

β -karoten-linoleik asit sisteminde test edilen hiçbir fenolik asit ve kombinasyonu standart olarak kullanılan BHT veya BHA'nın antioksidan aktivite değerlerine ulaşamamıştır. Azalan antioksidan aktivite değerlerine göre benzoik asit türevlerini BHA > BHT > SAA > *p*OHBA > VA > GA > proKA, sinamik asit türevlerini ise BHA > BHT > FA > KAA > *p*KUA > *tr*SİA > *o*KUA şeklinde sıralamak mümkündür.

β -karoten-linoleik asit sisteminde test edilmiş fenolik asit kombinasyonlarından en aktif olan beş tanesi BHA > BHT > *p*KUA+KAA > FA+KAA > *o*KUA+KAA > *tr*SİA +KAA > GA+proKA şeklinde sıralanmıştır.

Antioksidan aktivite tayinlerinde genel olarak bir yöntemde aktif olan maddeler kimyasal yapıları gereği diğer yöntemlerde de güçlü aktivite göstermektedirler. Ancak bazı durumlarda istisnalar olabilmektedir. Farklılıklar her tayin yönteminde görülen reaksiyon tiplerinden kaynaklanmaktadır. Örneğin DPPH bir madde ile direkt olarak reaksiyona girerken, β -karotenin solması

linoleik asidin primer oksidasyonu ile gizlenebilir. Bu farklılıklar antioksidan aktivite ölçümündeki değişikliklere bağlıdır. Bu değişiklikler ölçüm sırasında substrat veya ürünün izlenmesi veya deney koşulları ile yakından ilgilidir. Bu nedenlerle tüm yöntemler aynı sonuçları vermemektedir (Shahidi ve Naczki, 2004). Çalışmalarımız sırasında bu farklılıklarla karşılaşmışır.

Ayrıca fenolik asit kombinasyonları ile yaptığımız antioksidan aktivite çalışmalarında da oldukça anlamlı sonuçlara ulaştığımızı söyleyebiliriz. Hem DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayininde, hem de Ransimat yönteminde yüksek aktiviteye sahip fenolik asitlerin oluşturduğu kombinasyonların da güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Tablo 3’de Ransimat yöntemi sonuçlarında üç adet -OH grubuna sahip GA ile iki adet -OH grubuna sahip KAA’in test edilen fenolik asitler arasında lipid peroksidasyonu oluşumunu en fazla inhibe eden maddeler olduğu görülmektedir. Tablo 4.’de ise gallik ve kafeik asit kombinasyonlarının da test edilen kombinasyonlar arasında en güçlü etkilere sahip olduğu gözlenmektedir. Çalışmanın bu aşamasındaki sonuçlara fenolik asitlerin birbiri arasındaki sinerjik etkilerinde rolü olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4. Gallik ve Kafeik asit ile kombinasyonlarının antiradikal ve antioksidan aktiviteleri

	Antiradikal Aktivite	β -karoten linoleik asit sistemi	Ransimat Yöntemi
Fenolik asit ve kombinasyonları	% inhibisyon (12 μ g/ml)	% Antioksidan Aktivite	Bozunma İndisi (%0,1)
GA	97,18	36,24	13,06
GA + proKA	96,74	41,76	-
GA+VA	96,74	35,87	-
GA + pOHBA	91,72	38,08	-
GA+SAA	91,63	32,06	-
KAA	96,6	43,61	10,76
KAA+FA	83,71	49,75	-
KAA+pKUA	69,12	58,96	-
KAA+oKUA	60,5	46,92	-
KAA+trSIA	52,7	42,99	-

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar aslında bir başlangıç, fenolik asitlerin antioksidan ve antiradikal aktiviteleri konusunda birçok çalışma varken, kombinasyonları konusunda hiç çalışmaya rastlanmaması ise bir şansdır. Bitkiler aleminin binlerce üyesinin kimyasal yapısında onlarca fenolik asit bulunduğu düşünülürse bu bakır alanda denenecek pekçok kombinasyon olduğu göz ardı edilemez bir gerçektir. Bu nedenle denenecek her yeni kombinasyon mümkün olan en düşük konsantrasyonda güçlü bir doğal antioksidan olma yolunda yeni bir umut olacaktır.

6. KAYNAKLAR

ABDEL-WAHAB, M. H., EL-MAHDY, M. A., ABD-ELLAH, M. F., HELAL, G. K., KHALİFA, F., HAMADA, F. M. A., Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart, *Pharmacological Research*, **48**, 461-465, 2003

ABUDU, N., MILLER, J.J., ATTAELMANNAN, M., LEVINSON, S.S., Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E, *Clinica Chimica Acta*, **339**, 11-25, 2004

ABUJA, P.M., ALBERTINI, R., Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clinica Chimica Acta*, **306**, 1-17, 2001

ALISTE, A.J., MASTRO, N.L., Ascorbic acid as radiation protector on polysaccharides used in food industry, colloids and surfaces A: *Physicochemical and Engineering Aspects*, **249**, 131-133, 2004

Anonim, <http://www.sporcv.com/vitamin/serbestradikaller.php>, (Erişim) Ocak, 2005a.

Anonim, <http://www.biyokimya.8m.net/oksijen.html>, (Erişim) Ocak, 2005b.

Anonim, <http://www.duzen.com.tr/index.aspx?ISLEM=MAKALEGOSTER&ID=17> Düzen Laboratuvarlar Grubu, 1998, (Erişim) Ocak, 2005c.

Anonim, <http://www.ozon.com.tr/serbestradikaller.php>, (Erişim) Ocak, 2005d.

Anonim,

<http://www.gata.edu.tr/temelbilimler/biyokimya/seminer/OKS%C4%B0DAT%C4%B0F%20STRES.doc>, (Erişim) Ocak, 2005e.

Anonim, <http://www.magnettech.de/Blood.html>, (Erişim) Ocak, 2005f.

Anonim, <http://www.healthchecksyste.ms.com/antioxid.htm>, (Erişim) Ocak, 2005g.

Anonim, <http://dreampharm.com/yfreeradicals.asp>, (Erişim) Ocak, 2005h.

Anonim, <http://www.cce.cornell.edu/food/expfiles/topics/swanson/antioxidantsoverview.html>, (Erişim) Ocak, 2005i.

Anonim, <http://www.cancer.gov/newcenter/pressreleases/antioxidants>, (Erişim) Ocak, 2005j,

Anonim, <http://shop.store.yahoo.com/herbalpowers/antioxidants.html>, (Erişim), Ocak2005k.

ASHOK, B.T., ALİ, R., The aging paradox: free radical theory of aging, *Experimental Gerontology*, **34**, 293-303, 1999

AVIRAM, M., FUHRMAN, B., Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis, *Atherosclerosis*, **137**, 45-50, 1998

AZZI, A., RICCIARELLI, R., ZINGG, J.M., Non-antioxidant molecular functions of α -tocopherol (vitamin E) *FEBS Letters*, **519**, 8-10, 2002

BAGCHI, K., PURI, S., Free radicals and antioxidants in health and disease, *Eastern Mediterranean Health Journal*, **4**, 350-360, 1998

BERNSTEIN, J.A., ALEXIS, N., BARNES, C., BERNSTEIN, I.L., BERNSTEIN, J.A., NEL, A., PEDEN, D., DIAZ-SANCHEZ, D., TARLO S. M., WILLIAMS P.B., Health effects of air pollution, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **114**, 1116-1123, 2004

BIRT, D.F., HENDRİCH, S., WANG, W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, **90**, 157-177, 2001

BOHR, V.A., Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 804-812, 2002

BOVERIS, A., ALVAREZ, S., NAVARRO, A., The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock, *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1186-1193, 2002

BOZAN, B., ÖZTÜRK N., TUNALIER, Z., KOŞAR, M., BAŞER K.H.C., Antioxidant and free radical scavenging activities of eight *Salvia* species. *Chemistry of Natural Compounds*, **38**, 198-200, 2002

BOZAN, B., KOŞAR, M., TUNALIER, Z., ÖZTÜRK, N., BAŞER, K.H.C., Antioxidant and free radical scavenging activities of *Rhus coriaria* and *Cinnamomum cassia* extracts, *Acta Alimentaria*, **2**, 51-59, 2003

BROWN, J.M., YAMAMOTO, B.K., Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress, *Pharmacology & Therapeutics*, **99**, 45-53, 2003

BURDA,S., AND OLESZEK,W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **49**, 2774-79, 2001

BUTTERFIELD, D.A., LAUDERBACK, C.M., Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 1050-1060, 2002

CADENAS, E., PACKER, L., Handbook of Antioxidants, Marcel Dekker, Inc.,2nd Edition, New York, 279-337, 473-489, 2002

CALLAWAY, J. K., BEART, P.M., JARROTT, B., A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **39**, 155-162, 1998

CAMERA, E., PICARDO, M., Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *Journal of Chromatography B*, **781**, 181-206, 2002

CHATGILIALOGLU, C., O'NEILL, P., Free radicals associated with DNA damage, *Experimental Gerontology*, **36**, 1459-1471, 2001

CHEN,J.H., HO,C-T, Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **45**, 2374-8, 1997

CHISOLM, G. M., STEINBERG, D., The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview, *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 1815-1826, 2000

ÇIRAK, B., İNCİ, S., BERTAN, P.V., Lipid peroxidation in cerebral tumors, *Clinica Chimica Acta*, **327**, 103-107, 2003

CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I., WORTELBOER, H., ZANDEN, J., BLADEREN, P., The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **10**, 141-152, 2001

CONKLIN, P.L., Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant, *Trends in Plant Science*, **3**, 329-330, 1998

CUI, K., LUO, X., XU, K., MURTHY, V., Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, *Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **28**, 771-799, 2004

CUZZOCREA, S., REITER, R.J., Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury, *European Journal of Pharmacology*, **426**, 1-10, 2001

DAVIES, M.J., The oxidative environment and protein damage, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, Available online 13 September, 2004

De-GROOT, H. and NOLL, T., The crucial role of low steady state oxygen partial pressure in haloalkane of free radical mediated lipid peroxidation, Possible implication in haloalkane liver injury. *Biochemical Pharmacology*, **35**, 15-19, 1986

DILLON J, SKONIECZNA M, MANDAL K, PAIK D., The photochemical attachment of the *O*-glucoside of 3-hydroxykynurenine to alpha-crystallin: a model for lenticular aging, *Photochem Photobiology*, **69**, 248-53, 1999

DROGE, W., Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants, *Experimental Gerontology*, **37**, 1333-1345, 2002

DU, J., GEBICKI, J. M., Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 2334-2343, 2004

DUGGAN, S., RAIT, C., PLATT, A., GIESEG, S.P., Protein and thiol oxidation in cells exposed peroxyl radicals as inhibited the macrophage synthesis pterin 7,8-dihydroneopterin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1591**, 139- 145, 2002

DUNN, R.O., Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel) *Fuel Processing Technology*, In Press, Corrected Proof, Available online, 2004

DUHRSEN, K.H., KAMPKOTTER, A., Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**, 129-142, 2001

DÜNDAR, Y., ASLAN, R., Bir antioksidan olarak vitamin E. http://www.kkto.org.tr/geneltip/pdf/cilt9_3/antioksidan.pdf, (Erişim) Ocak, 2005p,

DZIEDZIC, S.Z., VE HUDSON, B.J.F. Hydroxy isoflavones as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*, **11**, 161-166, 1983

ELMER, M., CRANTON, M.D., JAMES, P., FRACKELTON, M.D., Scientific Rationale for EDTA Chelation Therapy, Mechanism of Action , A Textbook on EDTA Chelation Therapy 2nd Edition, Hampton Roads Publishing Company, Charlottesville, Virginia, 2001

- EPHRAIM, E., ODENYO, A., ASHENAFI, M., Isolation and characterization of tannin-degrading bacteria from faecal samples of some wild ruminants in Ethiopia, *Animal Feed Science and Technology*, **118**, 243-253, 2005
- ESPOSITO, E., ROTILIO, D., MATTEO, V., GIULIO, C., CACCHIO, M., ALGERI, S., A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes, *Neurobiology of Aging*, **23**, 719-735, 2002
- EVANS, M.D., DİZDAROĞLU, M., COOKE, M.S., Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **567**, 1-61, 2004
- FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J.A., Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. Cancer Society Research Centre, University of Auckland Faculty of Medicine and Health Science, New Zealand. *European Journal of Cancer Prevention* **8**, 17-25, 1999
- FERRARI, C.K.B., TORRES, E.A.F.S., Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, **57**, 251-260, 2003
- FRANKEL, E.N., MEYER, A., S., Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4107-4112, 2001
- FRANKEL, E.N., MEYER, A., S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food Agriculture*, **80**, 1925-1941, 2000
- FREI, B., Natural Antioxidants in Human Health and Disease, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1994
- FUJITA, K., KUBO, I., Antifungal activity of octyl gallate, *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 193-201, 2002
- FUKUMOTO, L.R., MAZZA, G., Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**, 3597-3604, 2000
- GALATI, G., O'BRIEN, P.J., Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 287-303, 2004
- GARROTE, G., CRUZ, J. M., MOURE, A., DOMÍNGUEZ H., PARAJÓ, J. C., Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials, *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 191-200, 2004

GONZÁLEZ, J., CRUZ, J. M., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C., Production of antioxidants from Eucalyptus globulus wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates, *Food Chemistry*, **84**, 243-251, 2004

GORINSTEIN, S., ZACHWIEJA, Z., KATRICH, E., PAWELZIK, E., HARUENKIT, R., TRAKHTENBERG, S., MARTIN-BELLOSO, O., Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **37**, 337-343, 2004a

GORINSTEIN, S., CVIKROVÁ, M., MACHACKOVA, I., HARUENKIT, R., PARK, Y., JUNG, S., YAMAMOTO, K., AYALA, A., KATRICH, E., TRAKHTENBERG, S., Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits, *Food Chemistry*, **84**, 503-510, 2004b

GULÇIN, I., SAT, I., BEYDEMİR, G. S., ELMASTAS, M., KUFREVIOGLU, O. I., Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata Thunb*) buds and lavender (*Lavandula stoechas L.*), *Food Chemistry*, **87**, 393-400, 2004

GÜMRÜKÇÜOĞLU, A., Vücudumuzda kanser ve kalp gibi hastalıklar için bir savaş veriyoruz. www.bioclub.hacettepe.edu.tr/makales/fizyo/05.html, (Erişim) Ocak, 2005.

HALLIWELL, B., Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?, *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 968-974, 2002

HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986, Chapman & Hall/CRC, p.638 USA 1994

HARIPRIYA, D., SANGEETHA, P., KANCHANA, A., BALU, M., PANNEERSELVAM, C., Modulation of age-associated oxidative DNA damage in rat brain cerebral cortex, striatum and hippocampus by L-carnitine, *Experimental Gerontology*, Available online 11 November 2004

HARMAN, D., Role of free radicals in aging and disease, *Annals of New York Academy of Science*, **673**, 126-141, 1992

HEADLAM, H. A., DAVIES, M.J., Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products, *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 1175-1184, 2004

HEINECKE J.W. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 1090-1101, 2002

HO, C., Phenolic compounds in food, American Chemical Society Symposium Series 506, 2-8, 1991

HUANG, M., FERRARO, T., Phenolic compounds in food cancer prevention, *American Chemical Society Symposium Series 507*, 8-35, 1991

HUGHES, L., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., SLABY, M., FOSTER, D.O., Custom design of better in vivo antioxidants structurally related to vitamin E, *American Chemical Society Symposium Series 507*, 184-200, 1991

IMAI, H., NAKAGAWA, Y., Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **34**, 145-169, 2003

ISHII, N., GOTO, S., HARTMAN, P.S., Protein oxidation during aging of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1021-1025, 2002

JAVANMARDI, J., STUSHNOFF, C., LOCKE E., VIVANCO, J. M., Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions, *Food Chemistry*, **83**, 547-550, 2003

JUNQUEIRA, V.B.C., BARROS, S.B.M., CHAN, S.S., RODRIGUES, L., GIAVAROTTI, L., ABUD, R.L., DEUCHER, G.P., Aging and oxidative stress, *Molecular Aspects of Medicine*, **25**, 5-16, 2004

KARASEK, M., Melatonin, human aging, and age-related diseases, *Experimental Gerontology*, In Press, Corrected Proof, Available online, 2004

KAYAALP, O., Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şirketi, Ankara, 9. Baskı, 370, 718-720, 1520-1523, 2000

KERRY, N. L., ABBEY, M., Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro, *Atherosclerosis*, **135**, 93-102, 1997

KHAN, M.A., SHAHIDI, F., Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols, *Food Chemistry*, **75**, 431-437, 2001

KIKUZAKI, H., HISAMOTO, M., HIROSE, K., AKIYAMA, K., TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**, 2161-68, 2002

KOCHANSKY, C.J., STREIN, T.G., Determination of uremic toxins in biofluids: creatinine, creatine, uric acid and xanthines, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **747**, 217-227, 2000

KRITHARIDES, L., STOCKER, R., The use of antioxidant supplements in coronary heart disease, *Atherosclerosis*, **164**, 211-219, 2002

KUZMANOVA, S. V., BORISOVA, P., B. GALUNSKA, I. KRASNALIEV AND A. BELCHEVA, Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **56**, 195-201, 2004

LABIENIEC, M., GABRYELAK, T., FALCIONIV, G., Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **539**, 19-28, 2003

LANDI, S., Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **463**, 247-283, 2000

LARSON, R. A., Naturally Occurring Antioxidants, Lewis Publishers, New York, 1997

LEE, A., MACLEAN, F., Adverse Drug Reactions, Pharmaceutical press, London, 217-240, 2003

LEJA, M., Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage, *Food Chemistry*, **72**, 19-22, 2001

LODOVIČI, M., GUGLIELMI, F., MEONI M., DOLARA P., Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 1205-1210, 2001

MACDONALD, L.K., GARG, M.L., Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **14**, 211-218, 2003

MARINOVA E.M., YANISHLIEVA, N.V., Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures, *Food Chemistry*, **81**, 189-197, 2003

MARTÍNEZ-CRUZ, F., GUERRERO, J., OSUNA, C., Melatonin prevents the formation of pyrrolized proteins in human plasma induced by hydrogen peroxide, *Neuroscience Letters*, **326**, 147-150, 2002

MARTINEZ-TOME, M., Comparison of the antioxidant and pro-antioxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives, *Journal of the Science of Food Agriculture*, **81**, 1019-26, 2001

MARUBAYASHI, S., ASAHARA, T., DOHI, K., Ischemia-reperfusion injury of liver and therapeutic intervention, *Hepatology Research*, **16**, 233-253, 2000

MCDONOUGH, K.H., Antioxidant nutrients and alcohol, *Toxicology*, **189**, 89-97, 2003

MCGILL, C.R., GREEN, N.R., MEADOWS, M.C., GROPPER, S.S., Beta-carotene supplementation decreases leukocyte superoxide dismutase activity and serum glutathione peroxidase concentration in humans, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **14**, 656-662, 2003

MELOV, S., Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 1395-1400, 2002

MERAM, I., AKTARAN, Ş., Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkisi, *Arşiv* 2002, **11**, 299, Tıp Fakültesi-Gaziantep, 2002

MINUSSI, R. C., ROSSI, M., BOLOGNA, L., CORDI, L., ROTILIO, D., PASTORE, G. M., DURÁN, N., Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, **82**, 409-416, 2003

MOENS, A.L., CLAEYS, M.J., TIMMERMANS, J.P., VRINTS, C.J., Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process, *International Journal of Cardiology*, In Press, Corrected Proof, Available online, 2004

MORAN, J. F., KLUCAS, R. V., GRAYER, R.J., ABIAN, J., BECANA, M., Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties, *Free Radical Biology and Medicine*, **22**, 861-870, 1997

MOROZZI, G., SERVILI, M., SELVAGGINI, R., ESPOSTO, S., TATICCHI, A., Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil, *Journal of Chromatography A*, **1054**, 113-127, 2004

MUNNIA, A., AMASIO, M.E., PELUSO, M., Exocyclic malondialdehyde and aromatic DNA adducts in larynx tissues, *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 850-858, 2004

NAIM, M., ZEHAVI, U., NAGY, S., ROUSEFF, R.L., Hydrocinnamic Acids as off- Flavor Precursors in Citrus Fruits and their Products, American Chemical Society Symposium Series 506, 180-192, 1991

NAMIKI, M., Antioxidants/Antimutagens in food, *Food Science and Nutrition*, **29**, 273-300, 1990

NAPOLI, C., IGNARRO, L.J., Nitric Oxide and Atherosclerosis, *Nitric Oxide*, **5**, 88-97, 2001

NORDBERG, J., ARNÉR, E.S., Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1287-1312, 2001

OHSHIMA, H., TATEMACHI, M., SAWA, T., Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **417**, 3-11, 2003

OKAI, Y., SATO, E.F., HIGASHI-OKAI, K., INOUE, M., Effect of endocrine disruptor para-nonylphenol on the cell growth and oxygen radical generation in *Escherichia coli* mutant cells deficient in catalase and superoxide dismutase, *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 1412-1418, 2004

OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., REITER, R.J., MIYAHARA, Y., Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated Mouse, *Neurobiology of Aging*, **23**, 639-644, 2002

OLINSKI, R., GACKOWSKI, D., ROZALSKI, R., FOKSINSKI, M., BIAŁKOWSKI K., Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development?, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **531**, 177-190, 2003

OWEN R.W., GIACOSA, A., HULL, W.E., HAUBNER, R., WURTELE, G., SPIEGELHALDER, B., Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, Division of toxicology and cancer risk factors, *German Cancer Research Center, Heidelberg*, **1**, 107-12, 2000

PACKER, L., HIRAMATSU, M., YOSHIKAWA, T., Antioxidant Food Supplements in Human Health, Academic Press., San Diego, New York, Boston , London, Sydney, Tokyo, Toronto, 239-251, 1999

PALOZZA, P., SERINI, S., NICUOLO, F., PICCIONI, E., CALVIELLO, G., Prooxidant effects of β -carotene in cultured cells, *Molecular Aspects of Medicine*, **24**, 353-362, 2003

PARK, J., YANG, J., YOON, S., LEE, J., YANG, E. S., PARK, J., Lipid peroxidation-mediated cytotoxicity and DNA damage in U937 cells *Biochimie*, **84**, 1198-1204, 2002

PERRIN, C., MEYER, L., Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection, *Food Chemistry*, **77**, 93-100, 2002

PEYRAT-MAILLARD, M. N., BONNELLY, S., BERSET, C., Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection, *Talanta*, **51**, 709-716, 2000

POSTON, L., RAIJMAKERS, M.T.M., Trophoblast Oxidative Stress, *Antioxidants and Pregnancy Outcome*, **25**, 72-78, 2004

QIAN, S.Y., BUETTNER, G.R., Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study, *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1447-1456, 1999

RAUEN, U., LI, T., SUSTMANN, R., GROOT, H., Protection against iron- and hydrogen peroxide-dependent cell injuries by a novel synthetic iron catalase mimic and its precursor, the iron-free ligand, *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 1369-1383, 2004

REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K.D., Natural products for cancer prevention: a global perspective, *Pharmacology & Therapeutics*, **99**, 1-13, 2003

REITER, R., Melatonin: clinical relevance, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **17**, 273-285, 2003

REITER, R., TAN, D.X., HERMAN, T.S., BURKHARDT, S., Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin, *Mechanisms of Ageing and Development*, **123**, 1007-1019, 2002

REITER, R., TAN, D.X., HERMAN, T.S., THOMAS, C., Melatonin as a radioprotective agent: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **59**, 639-653, 2004

RICE-EVANS, C.A., DIPLOCK, A.T., SYMONS, M.C.R., Techniques in Free Radical Research, Elsevier Science Pub., Amsterdam, London, New York, Tokyo, 1991

ROBBINS R.J., Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, Food Composition Laboratory, Beltsville *Human Nutrition Research Center*, USA, **10**, 2866-87, 2003

RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., PENAZZI, G., CABONI, M. F., BERTACCO, G., LERCKER, G., Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers, *Meat Science*, **45**, 365-375, 1997

SAMUEL, S., KATHIRVEL, R., JAYAVELU, T., CHINNAKKANNU, P., Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL- α -lipoic acid, *Toxicology Letters*, **155**, 27-34, 2005

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N.N., ANGELES, F.M., MOLCHOR, V.V., CONDEZO, L.A., LAO, J., MILLER, M.J.S., Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*, **79**, 207-213, 2002

SANGUINETTI, S.M., BATTHYÁNY, C., TROSTCHANSKY, A., BOTTI, H., LÓPEZ, G.I., WIKINSKI, R.L.W., RUBBO, H., SCHREIER, L.E., Nitric oxide inhibits prooxidant actions of uric acid during copper-mediated LDL oxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **423**, 302-308, 2004

SCHEIBMEIR, H.D., CHRISTENSEN, K., WHITAKER, S.H., JEGAETHESAN, J., CLANCY, R., PIERCE, J.D., A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses, *Intensive and Critical Care Nursing*, In Press, Corrected Proof, Available online, 2004

SENATOR, A., RACHIDI, W., LEHMANN, S., FAVIER, A., BENBOUBETRA, M., Prion protein protects against DNA damage induced by paraquat in cultured cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 1224-1230, 2004

SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A., SAURA-CALIXTO, F., A procedure to measure the Antiradical efficiency of phenols. *Journal of Science of Food Agriculture*, **76**, 270-276, 1998

SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A., SAURA-CALIXTO, F., Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International*, **32**, 407-412, 1999

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, K.J., Critical Reviews in Food Science, *Nutrition*, **32**, 67, 1992

SHAHIDI, F., NACZK, M., Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications, Technomic Publication, 235-277, 1995

SHAHIDI, F., NACZK, M., Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press, New York, 403-421, 2004

SHERMAN, B.D., An excerpt from the medical textbook contemporary ayurveda, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1998, (Erişim) Ocak, 2005.

SIEBERT B. D., KRUK Z.A., β -carotene and oxidative desaturation of fatty acids: a plausible explanation of the conflicting responses of coronary heart disease to β -carotene?, *Medical Hypotheses*, **62**, 950-953, 2004

SKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., HRAS, A. R., SIMONIC, M., KNEZ, Z., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chemistry*, **89**, 191-198, 2005

SORG, O., Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?, *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 649-662, 2004

SOUSA, W.R., ROCHA, C., CARDOSO, C.L., SILVA, S., ZANONI, M., Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods, *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 619-633, 2004

SROKA, Z., CISOWSKI, W., Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 753-758, 2003

STOKES, K.Y., COOPER, D., TAILOR, A., GRANGER, D.N., Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide, *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1026-1036, 2002

SUJA, K.P., ABRAHAM J.T., THAMIZH, S.N., JAYALEKSHMY, A., ARUMUGHAN, C., Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection, *Food Chemistry*, **84**, 393-400, 2004

SUMMAN, S., WALL, M.L., COOK, N.C. Flavonoids and coronary heart disease, Dietary perspectives : in *Flavonoids in Health and Disease*, ed. Rice-Evans, C.A., Packer, L. Marcel Dekker, Inc. New York, 469-482, 1997

TAKESHITA, K., FUJII, K., ANZAI, K., OZAWA, T., In vivo monitoring of hydroxyl radical generation caused by x-ray irradiation of rats using the spin trapping/epr technique *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 1134-1143, 2004

TAPIERO, H., TEW, K. D., NGUYEN BA, G., MATHÉ, G., Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, **56**, 200-207, 2002

TOWNSEND, D.M., TEW, D.V., TAPIERO, H., The importance of glutathione in human disease, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, **57**, 145-155, 2003

TUNALIER, Z., KOŞAR, M., ÖZTÜRK, N., BAŞER, K.H.C., DUMAN, H., KIRIMER, N., Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species, *Chemistry of Natural Compounds*, **40**, 206-210, 2004

TURRENS, J.F., Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa, *Molecular Aspects of Medicine*, **25**, 211-220, 2004

UM, S., LEE, J., KANG, Y., BAEK, D., The synthesis and properties of triazine-stilbene fluorescent brighteners containing the phenolic antioxidant, *Dyes and Pigments*, **64**, 93-99, 2005

URSO, M.L., CLARKSON, P.M., Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*, **189**, 41-54, 2003

VAYA, J., BELINKY, P., AVIRAM, M., Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation, *Free Radical Biology and Medicine*, **23**, 302-313, 1997

VIEIRA, O., LARANJINHA, J., MADEIRA, V., ALMEIDA, L., Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation : Concerted antioxidant activity of caffeic and *p*-coumaric acids with Ascorbate, *Biochemical Pharmacology*, **55**, 333-340, 1998

VIVEKANANTHAN, D.P., PENN, M.S., SAPP, S.K., HSU, A., TOPOL, E.J., Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials, *The Lancet*, **361**, 2017-2023, 2003

WALLACE, S.S., Biological consequences of free radical-damaged DNA bases' *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1-14, 2002

WETTASINGHE, M., SHAHIDI, F., Antioxidant activity of preformed cooked cured-meat pigment in a b-carotene/linoleate model system, *Food Chemistry*, **58**, 203-7, 1997

WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., The Merck Index, 10th edition, Merck&Co., Inc., U.S.A., 1983

WOLLGAST, J., ANKLAM, E., Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?, *Food Research International*, **33**, 449-459, 2000

YAAR. M., Cilt Yaşlanması, *Kozmetoloji Dergisi*, **1**, 2002
<http://www.dermaneturk.com/okd/sayi2/mikroskop2.asp>, (Erişim) Ocak, 2005.

YAMANAKA, N., ODA O., NAGAOV, S., Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation, *FEBS Letters*, **405**, 186-190, 1997

YILDIRIM, Z., TURKOZ, Y., KOTUK, M., ARMUTCU, F., GUREL, A., IRAZ, M., OZEN, S., AYDOGDU, I., AKYOL, O., Effects of aminoguanidine and antioxidant erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats, *Nitric Oxide*, **11**, 156-165, 2004,

YILMAZ, Y., TOLEDO, R.T., Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 422-433, 2004

YU, L., ZHOU, K., Antioxidants properties of bran extracts from 'Platte' wheat grown at different locations, *Food Chemistry*, **90**, 311-316, 2005

ZÁMOCKÝ, M., KOLLER, F., Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **72**, 19-65, 1999

ZAND, R., JENKINS, D.J.A., DIAMANDIS, E.P., Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers, *Journal of Chromatography B*, **777**, 219-232, 2002

ZAVODNIK, I.B., LAPSHINA, E.A., ZAVODNIK, L.B., ŁABIENIEC, M., BRYCZEWSKA, M., REITER, R.J., Hypochlorous acid-induced oxidative stress in Chinese hamster B14 cells: viability, DNA and protein damage and the protective action of melatonin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **559**, 39-48, 2004

ZHANG, P., OMAYE, S.T., β -Carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and α -tocopherol, *Toxicology*, **146**, 37-47, 2000