

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Helichrysum plicatum* DC. VE *Phlomis pungens* L. BİTKİLERİNİN
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN MUKAYESESİ**

Mesut IŞIK

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

**KİMYA
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2012**

Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Ekrem KOKSAL danışmanlığında, Mesut IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma 19/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAĞLAR

imza:

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

imza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa KORKMAZ

imza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Recep POLAT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Helichrysum plicatum* DC. VE *Phlomis pungens* L. BİTKİLERİNİN
ANTIÖKSİDAN AKTİVİTELERİNİN MUKAYESESİ****Mesut IŞIK**Erzincan Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışma *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin antioksidan aktivitesini incelemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bitki Erzincan ili Çayırlı ilçesinin Çilhorozu ve Sarıgüney köyünden toplandı, kurutuldu ve etanol ekstraktları hazırlandı. Hazırlanan etanol ekstraktları üzerinde ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, kuprak metodu ile Cu^{2+} ve potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile Fe^{3+} iyonları indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) giderme aktivitesi tayinleri ve toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktar tayinleri yapıldı. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinden elde edilen $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonluk etanol ekstraktlarının linoleik asit emülsiyonunun lipid peroksidasyonunu sırasıyla %77,4 ve %70,2 inhibe ettiği gözlemlendi. Aynı konsantrasyonda α -tokoferol %85,3 ve troloks %83,1' lik bir inhibisyona sebep oldu. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği ve *Phlomis pungens*'den daha fazla olduğu tespit edilen bitkilerden *Helichrysum plicatum* yine daha yüksek DPPH giderme aktivitesi sergiledi. Etanol ekstresi çıkarılan *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin antioksidan aktiviteleri araştırılırken, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), α -tocopherol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks referans antioksidan bileşikleriy olarak kullanıldı.

2012, 61 sayfa**Anahtar Kelimeler:** *Helichrysum plicatum*, *Phlomis pungens*, Antioksidan aktivite, Metal indirgeme

ABSTRACT

Master Thesis

***Helichrysum plicatum* DC. AND *Phlomis pungens* L. PLANTS OF
COMPARİSON OF THE ANTIOKSIDANT ACTIVITIES****Mesut IŞIK**Erzincan University
Faculty of Sciences and Arts
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

This study is aimed to examine the antioxidant activities of *Helichrysum plicatum* and *Phlomis pungens* plants. For this purpose, plants were collected from Çilhorozu and Sarigüney which is the village of Çayırılı, a town of Erzincan province, and they were dried and ethanol extractions were prepared. On prepared ethanol extraction total antioxidant activity was determined by ferrocyanate reduction method; Cu^{2+} and potassium ferric thiocyanate were determined by Cuprac method; was determined by reduction method capacity of Fe^{3+} ions; the activity of scavenging of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) was determined; the total amount of the compounds of phenolic and flavonoid was determined. It was observed that $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentrated of ethanol extracts obtained from *Helichrysum plicatum* and *Phlomis pungens* plants inhibited the lipid peroxidation of linoleic acid emulsion as 77,4 % and 70,2% respectively. In the same concentration, α -tokoferol and trolox caused inhibitions of 85,3 % and 83,1 %, respectively. *Helichrysum plicatum* plant in which it was detected that the content of total phenolic and flavonoid were much more than those in *Phlomis pungens* plant still displayed higher DPPH scavenging activity. Butylated hydroxy toluen(BHT), α -tocopherol and an analogue of its which is the solved in water, namely Trolox were used as reference antioxidant compounds, while the antioxidant activity of *Helichrysum plicatum* and *Phlomis pungens* plants whose ethanol extractions were taken out were being examined.

2012, 61 pages**Keywords:** *Helichrysum plicatum*, *Phlomis pungens*, Antioxidant activity, Metal reduction.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan, maddi manevi ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAĞLAR'a, Biyoloji bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarımızda bizlere göstermiş olduğu yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e şükranlarımı sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Emrah DİKİCİ'ye teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Hüseyin KANBUR, Mehmet MORTAŞ ve Fatih TOZOĞLU'na teşekkür ederim. Kimya Bölümü araştırma görevlisi Ekrem ADIGÜZEL'e, Biyoloji Bölümü araştırma görevlisi Veli İLHAN'a ve Biyoloji Bölümü yüksek lisans öğrencisi Zeynettin ALPASLAN'a minnettarım.

Her aşamada yanımda olan ailemin her türlü desteğinden dolayı kendilerine şükranlarımı sunarım.

Mesut IŞIK
Temmuz, 2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Materyal	31
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	31
3.1.2. Yararlanılan malzeme, alet ve cihazlar	31
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	32
3.1.3.a. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler	32
3.1.3.b. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler	32
3.1.3.c. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler	32
3.1.3.d. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini ile ilgili çözeltiler	33
3.1.3.e. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler	33
3.1.3.f. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> bitkilerinin toplanması ve kurutulması	35
3.2.2. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> bitkilerinin etanol ekstrelerinin hazırlanması	35
3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini	35
3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini	36

3.2.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini	37
3.2.6. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini	38
3.2.7. Kuprak metoduna göre idirgeme kapasitesi tayini.....	38
3.2.8. DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	40
4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları.....	40
4.1.1. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları.....	40
4.1.2. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulguları	41
4.1.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini bulguları	43
4.1.4. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti bulguları.....	44
4.1.5. Kuprak metodu ile ilgili bulgular.....	45
4.1.6. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi bulguları.....	46
4.2.Tartışma.....	48
5. SONUÇ.....	52
6. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde Değer
⁰ C	Santigrat derece
•	Radikal
α	Alfa

Kısaltmalar

BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH•	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radikal
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
R•	Organik Radikali
ROO•	Peroksit Radikali
RO•	Alkoksi Radikali
RS•	Tiyil Radikali
RSO•	Sülfenil Radikali
OH•	Hidroksi Radikali
TBHQ	Tersiyerbütihidrokinon
PG	Propil Galat
POD	Peroksidaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GSSG-Rx	Glutatyon Redüktaz
GAE	Gallik Asit Ekvivalent

$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit Radikali
QE	Kuarsetin Ekvivalent
L	Lipid
SOD	Süperoksit Dismutaz
MDA	Malondialdehit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
N_2	Azot Gazı
O_2	Oksijen Gazı
NH_3	Amonyak
CuZnSOD	Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz
$FADH_2$	İndirgenmiş Flavin Adenin Dinükleotit
FeSOD	Demir İçeren Süperoksit Dismutaz
Hb	Hemoglobin
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
MnSOD	Mangan İçeren Süperoksit Dismutaz
$NAD(H)^+$	Nikotinamit Adenin Dinükleotit
$NADP(H)^+$	Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
TCA	Triklor Asetik Asit
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu.....	6
Şekil 2. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması.....	14
Şekil 3. Yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanması.....	15
Şekil 4. Lipid peroksidasyonu.....	16
Şekil 5. Malondialdehit (MDA).....	16
Şekil 6. α -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikale dönüşmesi.....	22
Şekil 7. Doğal bir antioksidan olan tokoferollerin moleküler yapıları.....	23
Şekil 8. Doğal bir antioksidan olan askorbik asitin moleküler yapısı.....	23
Şekil 9. Önemli bir doğal antioksidan olan β -karotenin moleküler yapısı.....	24
Şekil 10. Sıklıkla kullanılan bazı doğal ve sentetik antioksidanların açık kimyasal yapıları.....	26
Şekil 11. <i>Helichrysum plicatum</i>	28
Şekil 12. <i>Phlomis pungens</i>	29
Şekil 13. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan gallik asitin açık yapısı.....	40
Şekil 14. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için gallik asit ile hazırlanan standart grafik.....	41
Şekil 15. Standart ve iyi bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı.....	41
Şekil 16. 10-50 μg arasında kuersetin kullanılarak toplam flavonoit miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği.....	42
Şekil 17. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> bitkilerinin etanol ekstratlarının 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ deki konsantrasyonda toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	43
Şekil 18. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> bitkilerinin etanol ekstratlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	44
Şekil 19. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> bitkilerinin etanol ekstratlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks karşılaştırması.....	45

Şekil 20. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının giderilmesi.	46
Şekil 21. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> bitkilerinin etanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda ($10\text{--}30\ \mu\text{g mL}^{-1}$) DPPH serbest radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol, troloks ve BHT ile karşılaştırması.....	47

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları	5
Tablo 2. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri	12
Tablo 3. Bazı antioksidanlar.....	19
Tablo 4. Bazı doğal antioksidanlar ve buldukları kaynaklar.....	25
Tablo 5. <i>Helichrysum plicatum</i> ve <i>Phlomis pungens</i> Bitkilerinin etanol ekstralarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının ekivalent olarak miktarları	52

1. GİRİŞ

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda ortaklanmamış bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri denilmektedir (Çavdar vd., 1997).

Serbest radikaller, hem vücudumuzun normal metabolik faaliyetleri sırasında, hem de kimyasal ajanlar, radyasyon, alkol, sigara, ağır metaller gibi pek çok dış kaynaklı etkenlerle oluşabilen moleküllerdir. Kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve oldukça reaktiftirler. Serbest radikallerin yüksek oranda reaktif bileşikler olmaları, en dış yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içermelerinden dolayı kolayca diğer organik ve anorganik moleküllerle reaksiyona girmelerinden ileri gelir. Aslında serbest radikaller, hücrelerin enerji üretiminde rol oynadıkları gibi, vücudun normal metabolik faaliyetleri sırasında gerçekleşen pek çok yararlı biyokimyasal süreçlerin içinde de yer alırlar. Oksidasyon sonucu kısa süreli oluşan serbest radikaller vücudumuzun antijenlerle savaşmasında bağışıklık sistemine yardımcı olurlar. Ancak çevresel ajanların da etkisiyle aşırı miktarlarda oluştuklarında durum değişir ve hücre hasarına neden olabilirler (Whitehead *et al.*, 1992)

Reaktif oksijen türleri insan vücudunda normal metabolik prosesler sonucunda sürekli olarak üretilmektedir (Langseth, 1995). Birçok fizyolojik proseste önemli bir rol oynayan oksijen serbest radikallerinin, vücuttaki birçok oksidatif biyokimyasal reaksiyonun başlıca yan ürünü olduğu ve biyolojik moleküllere etki ederek çeşitli hastalıklara neden olan hücre ya da doku hasarına yol açtığı bilinmektedir (Hoffmann and Garewal, 1995; Yen and Chen, 1995).

Anlatılan bu olayların engellenmesinde antioksidanların rolü reaktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri temizleyerek oksidasyonun teşvik ettiği hasarları hücresel bazda engellemek, dolayısıyla dejeneratif hastalıkların

oluşumunu durdurmaktadır. Antioksidanlar, besinlerde doğal olarak bulunduğu gibi sentetik olarak da üretilerek besinlere ilavesi halinde, otoksidasyondan kaynaklanan ve onların renk, koku ve tatlarında meydana gelen bozulmaları önlemek için de katkı maddesi olarak kullanılabilir. Antioksidan grubu katkı maddeleri, gıda sanayisinde bitkisel ve hayvansal yağ içeren maddelerin üretimi, taşınması ve pazarlanması sırasında meydana gelecek otoksidasyondan kaynaklanan zararları önlemede en önemli katkı maddeleridir. Bunların önemli özellikleri, ortamda pek az miktarda, binde ve hatta onbinde bir oranında bulunsalar bile etkin olmalarıdır (Gündüç, 2000)

Antioksidanlar; doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılarak incelenir. Doğal antioksidanlar, besinlerde var olan ve onların bozunma, ekşime, renk değiştirme gibi reaksiyonlarını önleyen maddelerdir. Sentetik antioksidanlar üretilerek besinlere eklenir. En çok kullanılan sentetik antioksidanlar fenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşikler serbest radikalleri tutma, lipid peroksidasyonunu önleme, anti-inflamatuar hareketler ve siklo-oksigenaz, lipoksigenaz ve fosfolipaz A2 gibi enzimleri inhibe etme gibi birçok özelliklere sahip olmasının yanında, yakın zaman önce de LDL oksidasyonunun etkin inhibitörü olarak gösterilmişlerdir (De Whalley *et al.*, 1990; Diplock *et al.*, 1998; Kanner *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1998; Vinson *et al.*, 1995).

Oksijen kaynaklı olan reaktif radikallerin hücrede aşırı miktarda oluşmaları "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Bu olay, tüm hücre bileşenleri (karbohidratlar, proteinler, yağlar) üzerinde tahrip edici etkiye sahiptir. Aynı zamanda "hidroksil radikali" başta olmak üzere birçok serbest radikal, genetik materyalimiz olan DNA'daki nükleik asit bazlarının değişimine ve DNA zincirinde kırılmalara neden olarak kanser oluşumu, hücre yaşlanma ve hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatıp ilerletebilirler (Hertog *et al.*, 1993)

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (Çavdar vd., 1997). Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini azaltarak veya ortadan kaldırarak onların neden oldukları

dejeneratif hastalıkları ve erken yaşlanma süreçlerini başlatan zincirleme reaksiyonları engelleyen moleküllerdir. Serbest radikaller kararsız ve reaktif moleküller olmalarına yol açan elektron açığına kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşmak üzere onlara saldırırlar. Antioksidanlar ise, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluştururlar. Eğer serbest radikaller almak istedikleri elektronu antioksidanlardan sağarlarsa başka bir yapıya zarar vermezler. Antioksidanlar, organizma tarafından sentezlenen ya da dışardan besinlerle alınan maddeler olup, oksidan moleküllerin hücreye zarar vermesini engellerler (Çavdar vd., 1997).

Oksidatif stres süreci, normal biyolojik reaksiyonlarda dahi sürekli oluşum içinde olan serbest radikallerle bu moleküllerin etkilerini ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan bir durumdur (Whitehead *et al.*, 1992).

Serbest radikallerle antioksidanlar dengede olduğu sürece oksidatif stresten kaynaklanan zararlar ortaya çıkmaz. Ancak sigara, alkol, pestisitler, gıda katkı maddeleri, petrokimya ürünleri, otomobil egzozlarından çıkan ağır metaller, çok çeşitli endüstriyel kimyasallar, x- ışınları, UV ışınları, hatta stres ve egzersiz yapılmaması gibi serbest radikal oluşumuna neden olan pek çok etken bulunmaktadır. Bu anlamda serbest radikallerle antioksidan moleküller arasındaki dengenin korunması ve sürdürülmesi çok önemlidir. Antioksidan bakımından zengin yiyeceklerin tüketilmesi ya da antioksidan ilaçların kullanılması bu dengenin korunması ve sürdürülmesini sağlamaktadır. Bu nedenle bitkilerin antioksidan içeriklerinin araştırılması günümüzde saydığımız nedenlerle oldukça önem kazanmıştır Diğer taraftan yiyeceklerin üretimi ve depolama sürecinde bozulmasını geciktiren veya önleyen sentetik antioksidanların çeşitli yan etkileri vardır. Daha sağlıklı yiyecekler üretmek için sentetik antioksidanlara alternatif olarak doğal kaynaklı antioksidan maddeler bulabilmek amacıyla bitkilerin bu özelliklerinin incelenmesi yönündeki araştırmalar artmıştır (Çavdar vd., 1997).

ROS terimi, okside edici etkileri olan hem oksijen türlerini hem bazı nonradikal bileşikleri içeren geniş bir terimdir. Tüm oksijen radikalleri ROS'tur, ancak tüm ROS'lar oksijen radikali değildir (Halliwell, 2006).

Son yıllarda antioksidan kaynaklı bitkiler araştırılmakta ve bunların antioksidan kapasiteleri belirlenmektedir. Bu çalışmalarla, serbest radikaller ile antioksidan dengesinin bozulmasının zararlı etkilerini yok etmenin yolları aranmaktadır. Serbest radikaller hem zararlı hem faydalı çoğu biyolojik süreçlerde temel rol oynayan yüksek reaktif bileşiklerdir. Bu türlerin niteliği ve belirlenmesi doku ve hücre üzerinde patolojik ve normal fonksiyonların iyi anlaşılmasına katkı sağlamakta önem arz eder.

Serbest radikaller, bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren atomik veya moleküler yapıdaki maddelerdir. Radikaller eşleşmemiş elektronlarından dolayı kimyasal olarak çok aktiftirler ve ortamdaki diğer biyomoleküllere saldırarak onların biyolojik yapılarını bozarlar. Bu radikalik ve reaktif ara ürünler nükleik asitler, proteinler ve lipitleri oksitleyebilir ve metabolizmada olumsuz neticeler oluşturabilirler. Antioksidan sistemler bu radikal ve reaktif ara ürünleri gidererek olumsuz etkilerini yok ederler (Fantel, 1996; Stadtman, 2002; Temple, 2000).

Kuantum kimyasına göre bir bağ yapısına ancak iki elektron girebilir. Ayrıca iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri oldukça kararlıdır. İnsan vücudunun neredeyse tüm elektronları, elektron çifti halinde bulunur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya ikisi de bir atoma katılır ya da ayrılarak her biri bir atomda kalır. Birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur fakat ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp görevlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri tehlikeli bazen de kullanışlı yapar (Fantel, 1996).

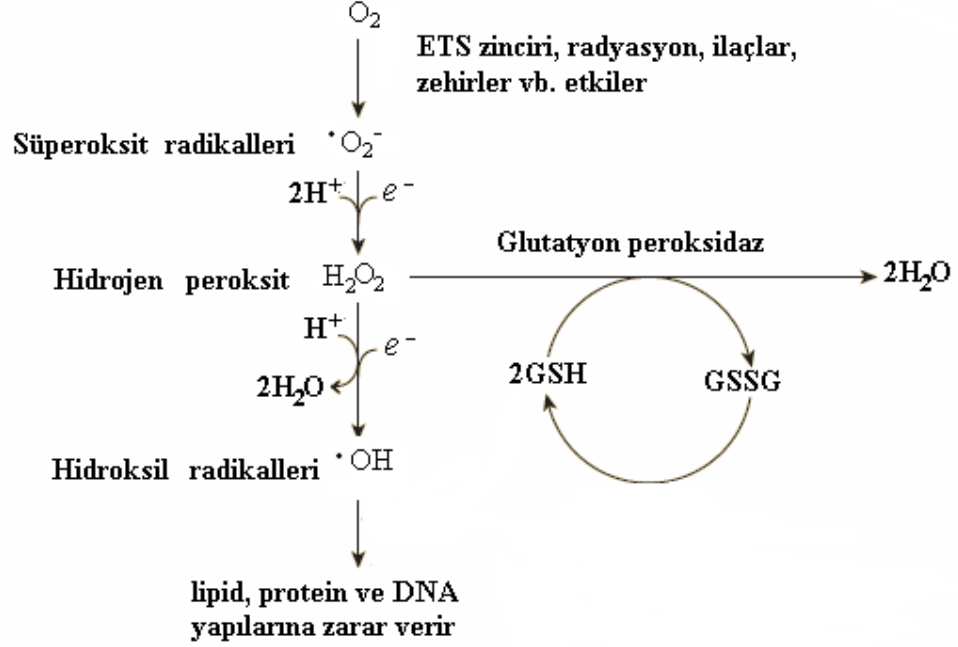
Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Bununla beraber eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bilim adamları 1954'lerden beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bilmektedirler. Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur (Nelson and Cox, 2004; Gülçin, 2007).

Metabolizmadaki serbest radikaller, reaktif oksijen türlerinden oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin oluşma kaynakları ise elektron taşıma sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik kaynaklar ve UV ışınları, radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, beslenme, kanserojen maddeler gibi dış kaynaklardır. Serbest radikal ve reaktiflerin bazı endojen ve ekzojen kaynakları Tablo 1.'de gösterilmiştir (Aksoy, 2002; Gülçin, 2006)

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları

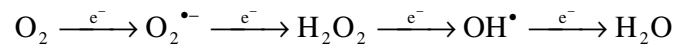
Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondrial elektron taşıma zinciri	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Fagositik ve endotelial hücrelerdeki	Zararlı ışınlar (x-ray, UV)
Oksidatif reaksiyonlar	Ksenobiyotikler
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit metabolizması	Organik solventler
Enzimler (Ksantin oksidaz, NADPH Oksidaz vs.)	Pestisitler

Metabolizmada oluşan ve dış kaynaklı radikal ve reaktiflerin oluşum yolları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Nelson and Cox, 2004).



Şekil 1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu (Bursal, 2009)

Glikoliz, yağ asitleri ve TCA devrinde oluşan NADH ve FADH₂'de bulunan yüksek indirgeme potansiyeline sahip elektronlar, mitokondri iç membranında elektron transport sistemi adı verilen bir yolla moleküler oksijene (O₂) transfer edilir. Mitokondrial elektron transport sisteminde, elektronların O₂'ye transferi sırasında oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri oluşur. Bu ürünler çok reaktif yapıdadırlar ve biyomoleküllerin yapılarına girerek dönüşümsüz zarar görmelerine sebep olurlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Bu reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikali (O₂^{•-}), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalının (OH[•]) oluşum reaksiyonları aşağıda verilmiştir.



Yaşamın devamı için havanın moleküler oksijenini (O_2) tükettiğimizi biliyoruz. Total oksijen tüketimimizin %90'ından fazlasından elektron transport zinciri (solunum zinciri), %5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Elektron transport zincirinde moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve $FADH_2$ 'den Elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür (Akkuş, 1995).

Moleküler oksijen gerektiren fakat ATP' nin oluşumu reaksiyonuyla eşleşmeyen diğer reaksiyonlar, aminoasitlerin katabolizması, ilaçların detoksifikasyonu ve steroid hormonların sentezi gibi spesifik metabolik yollar için önemlidirler. Bu reaksiyonlarda diğer oksidazlar (oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler) ve oksijenazlar (oksijeni okside olan moleküle bağlayan enzimler) görev alırlar (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).

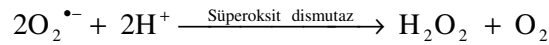
Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir. Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (Dawn *et al.*, 1996).

Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları

meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).

Canlılarda hidroksil OH•, süperoksit O₂^{•-}, nitrik oksit NO• ve peroksit ROO• gibi serbest radikaller oldukça önemlidir. Tıp ve biyolojide serbest radikallerin rolü ve önemi ile ilgili çalışmalar bir hayli fazladır (Halliwell and Gutteridge, 1989; Weiss 1989; Aruoma, 1991). Oksidatif stresin memeli hücrelerinde serbest Ca²⁺ ve demir düzeyinde artışa yol açtığı gözlemlenmiştir (Orrenius, 1989; Bast, 1993). Orrenius ve arkadaşları intraselüler serbest Ca²⁺'nin aşırı artışı sonucu aktifleşmiş endonükleazlar tarafından DNA'nın parçanabileceğini öne sürmüşler. Oksidatif stres hasarları, moleküler hedefe, stresin şiddeti ve mekanizmasına, oksidatif strese, Fenton kimyasına, travmaya, NO• sentez gibi enzim aktivasyonlarına ve nitrik oksijen türlerinin aktivitelerine bağlıdır (Ak, 2006).

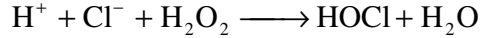
Moleküler oksijenin bir elektronunun redüksiyonu ile süperoksit anyon radikali oluşur. Süperoksit anyon radikali nispeten stabil olduğundan esleşmemiş elektronu ile değil, yükü ile tanımlanmaktadır (O₂^{•-}). Süperoksit, arterlerde ve merkezi sinir sisteminde haberci bir molekül olarak düşünülmüştür. (Fantel, 1996). Biyolojik sistemlerdeki kararsızlığı ve zayıf membran geçirgenliğinin olması bazı araştırmacıların intraselüler ulak olarak sınırlı olduğunu düşünmelerine neden olmuştur (Saran and Bors, 1994). Süperoksit anyon radikali perokside dönüşebilir. Bu da, proton alarak aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi hidrojen peroksit oluşturabilir:



Spontan reaksiyon fizyolojik pH'da yavaş gerçekleşir. Ancak SOD tarafından katalizlendiğinde hızlıdır ve nispeten pH'dan bağımsız olarak ilerler (Fantel, 1996). Organizmada en az üç farklı süperoksit dismutaz enzimi vardır. Biri mitokondriyal

matriste yer alan manganez formudur (Mn-SOD). Ayrıca iki adet bakır ve çinko formu (Cu, Zn-SOD) bulunmaktadır. Bunlardan biri sitozolde ve diğeri çeşitli ekstrasellüler sıvılarda yer alır (Fantel, 1996). Moleküler oksijene bir elektron bağlanmasıyla oluşan süperoksit anyonu bir serbest radikal olmasına karşın çok fazla reaktif değildir. Lipid membranların geçirgenlik yeteneğini azaltır ve bu nedenle üretildiği kompartmanda çevrili olarak bulunur (Nordberg and Arnér, 2001). Süperoksit, özellikle solunum zinciri ile birlikte mitokondriyal membranın iç yüzeyinde elektrondan zengin aerobik bir ortamda kendiliğinden oluşmaktadır. Süperoksit ve ayrıca hidrojen peroksit iskemi-reperfüzyonda aktive olan flavoenzimler, örneğin, ksantin oksidaz, tarafından endojen olarak da üretilmektedir. Diğer süperoksit-üretici enzimler lipoksijenaz ve siklooksijenazdır. Fagositik hücrelerde membrana bağlı bir enzim kompleksi olan NADPH'a bağımlı oksidaz yüksek düzeyde $O_2^{\bullet-}$ üretimine neden olur. İki molekül süperoksit hızlıca hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür ve bu reaksiyon ayrıca SOD ile hızlandırılır (Nordberg and Arnér, 2001).

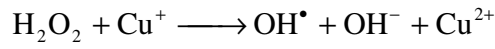
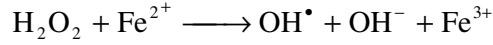
Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için nonradikal özelliğe sahip bir reaktif oksijen türüdür. Ancak demir ve bakır gibi atomlarla tepkimeye girerek çok güçlü bir reaktif olan hidroksil radikalini (OH^{\bullet}) oluşturur. Hidrojen peroksit kolayca hücre içerisine girebilir ve hem gruplarında Fe^{2+} 'in yapısına girerek bunları güçlü oksitleyici durumlarına getirebilmektedir. Ayrıca hidrojen peroksit reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Asad *et al.* 2004).



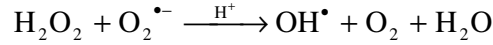
Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit

radikalinin ($O_2^{\bullet-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^\bullet) oluşturur.

Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:

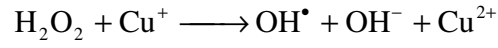
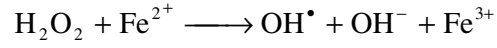


Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Ak, 2006).

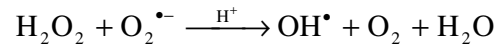
Süperoksit radikalının yağda çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit yağda çözünür. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).

Hidroksil radikali; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok güçlü bir şekilde saldırarak oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakan ve yarı ömrü 10^{-9} saniye gibi çok kısa olan bir reaktif oksijen türüdür. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucunda açığa çıkar. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir (Fantel, 1996; Halliwell, 2000; Nordberg and Arner, 2001).

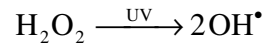
Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



Ayrıca hidrojen peroksitin UV ışınlarının etkisiyle hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir.



Metabolizmada süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalinden başka reaktif oksijen türleri ile reaktif azot türleri de vardır. Bu radikal ve reaktif türlerinden bazıları Tablo 2’de gösterilmiştir (Gümüştaş ve Atukeren, 2008).

Tablo 2. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri

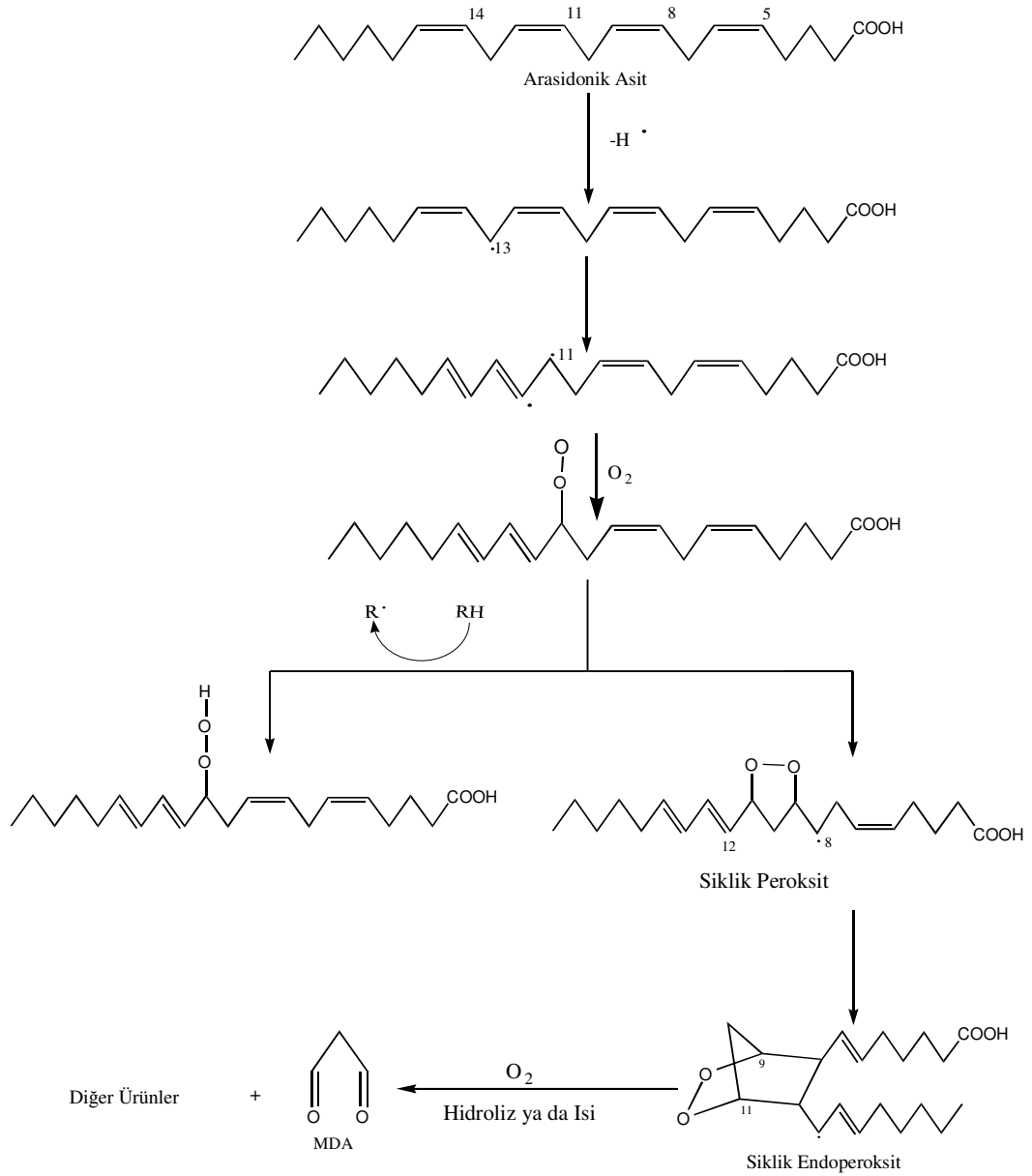
Reaktif oksijen türleri		Reaktif azot türleri	
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet-}$	Nitrik oksit radikali	NO^{\bullet}
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Azot dioksit radikali	NOO^{\bullet}
Hidroksit radikali	OH^{\bullet}	Peroksinitrit radikali	$ONOO^{\bullet}$
Hipokloröz asit	$HOCl$	Nitröz asit	HNO_2
Singlet oksijen	1O_2	Nitrozil katyonu	NO^+
Organik radikaller	$RO^{\bullet}, R^{\bullet}, R-S^{\bullet}$	Nitroksi anyonu	NO^-
Peroksil radikali	$RCOO^{\bullet}$	Peroksinitrit	$ONOO^-$

Diğer bir oksijen içeren radikal olan nitrik oksit (NO), biyoloji ve tıpta yoğun olarak araştırılmaktadır (Fantel, 1996). Henüz tam olarak anlaşılmamış bir reaksiyonda, nitrik oksit sentetaz L-arjinin'i L-sitrullin ve nitrik oksite okside eder (Griffith and Stuehr, 1995). NO'nun damar genişletici rolü iyi bilinmektedir (Lowenstein and Snyder, 1992) ve NO ve süperoksit anyon radikalinin damar durumunun belirleyicileri olarak antagonist biçimde işlev gösterdikleri öne sürülmüştür. NO'nun yarı ömrü saniyeler boyutunda olduğundan onun in vivo ekstrasellüler mesaj dönüştürücü olarak görev yapmak için yeterince stabil olan tek oksijen radikali olduğunu belirtmişlerdir. NO'nun yarı ömrü tiyollerle reaksiyon yoluyla önemli ölçüde artırılabilir. Bu reaksiyon NO biyoaktivitesini koruyan fakat saatler boyutunda yarı ömre sahip olan S-nitrozotiyol türevlerini oluşturur (Saran and Bors, 1994).

Nitrik oksit serbest radikal ailesinin farklı bir üyesini temsil eder ve çeşitli yönlerden $O_2^{\bullet-}$ ile benzerdir; eşleşmemiş elektronuna rağmen birçok biyomolekülle hemen etkileşime girmez. Diğer taraftan diğer serbest radikallerle (örneğin, peroksil ve alkil radikaller) kolayca reaksiyona girerek temelde daha az reaktif molekülleri üretirler, bu nedenle aslında bir serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmaktadır; mesela, NO'nun hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Rubbo *et al.*, 2000). Eğer $O_2^{\bullet-}$, NO ile paralel olarak yüksek miktarlarda üretilirse, bu ikisi birbirleriyle etkileşerek oldukça sitotoksik olan $OONO^{\bullet}$ (peroksinitrit)

radikalini üretirler (Beckman and Koppenol, 1996). Peroksinitrit birçok biyomolekülle doğrudan bir- veya iki-elektron reaksiyonuna girebilir, hızlıca CO₂ ile reaksiyona girerek oldukça reaktif peroksokarboksilat (ONOOCO²⁻) oluşturabilir veya proton alarak peroksonitroz asit olarak ya OH• ve •NO₂ oluşturmak için hemolize uğrar ya da yeniden nitrat (NO₃) oluşturur. Peroksinitritin bu değişik reaksiyonlarının bireysel hızları, pH'ya, sıcaklığa ve çevresel ortamda bulunan bileşenlerin tiplerine bağlıdır (Radi *et al.*, 2001). Peroksinitrit, doğrudan veya reaksiyon ürünleri vasıtasıyla, çoğu iltihabı hastalıkta gözlemlendiği gibi, LDL'yi yükseltgeyebilir, seruloplazmin'e zarar vererek bakır iyonlarını salabilir ve genellikle değişik proteinlerde bulunan tirozin kalıntularına saldırabilir (Halliwell, 1997; Nordberg and Arner, 2001). NO, enzimatik olarak L-arjinin'den NO sentetaz (NOS) aracılığıyla sentez edilir (Andrew and Mayer, 1999):

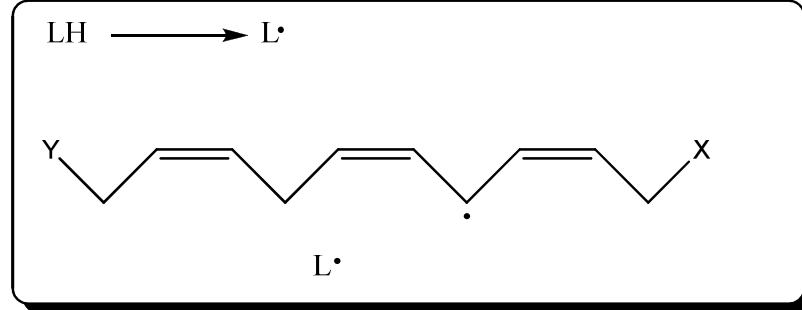
Peroksi radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerin oksidasyonu esnasında meydana gelen ara ürünlerdir. Lipit peroksidasyonu, membranda bulunan aradişonik asit veya linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin yan zincirinden bir hidrojen atomunu koparacak kadar reaktiviteye sahip olan herhangi bileşik tarafından meydana getirilebilir. Araşidonik asit, prostagladin, tromboksan ve lökotrienlerin ön bileşimidir, özellikle hidrojen atomu koparılmaya meyilli olan birçok çift bağ içerir (Esterbauer *et al.*, 1992).



Şekil 2. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması (Gülçin, 2002).

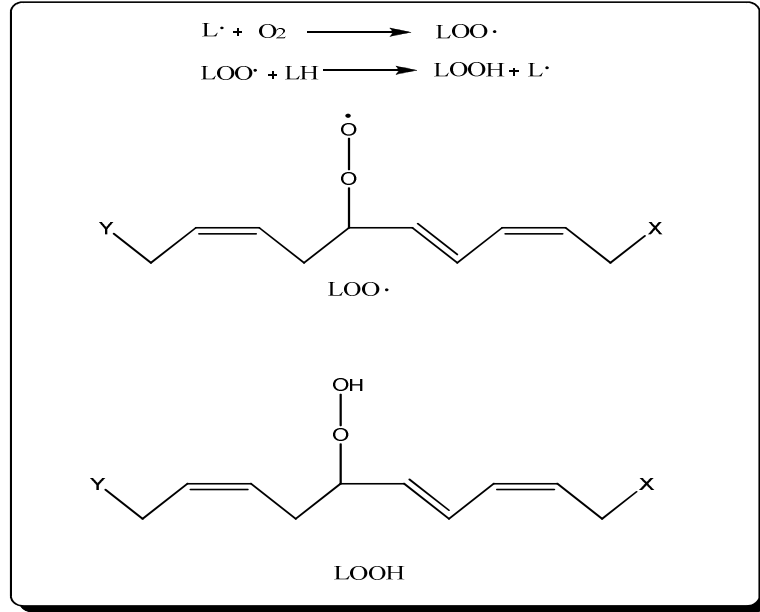
Lipit peroksidasyonun biyolojik önemi ve mekanizması hakkında birçok makale olmasına rağmen, ölçülmeye ilgili metotlar için bir görüş birliği bulunmamaktadır. DNA tamiri, proto-onkogen aktivasyon ve lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin bazı özellikler arasındaki bağlantı, büyük ölçüde kanser promotörü olarak değerlendirilir (Cerruti, 1985; Cheeseman, 1993).

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($L\cdot$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO\cdot$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar (Esterbauer *et al.*, 1992).



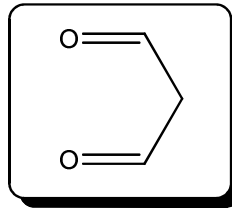
Şekil 3. Yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanması

Lipid radikali ($L\cdot$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ($L\cdot$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($LOO\cdot$) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ($LOO\cdot$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Cheeseman, 1993).



Şekil 4. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksidlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subzellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallere varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ($OH\cdot$) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipid peroksidleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir (Burtis and Ashwood, 1999).



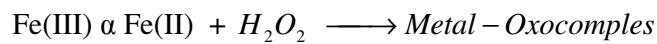
Şekil 5. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Tietz, 1995).

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur (Dawn *et al.*, 1996).

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).



İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH^{\cdot}) deoksiriboz ve bazlarla

kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nütrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksida ($O_2^{\cdot-}$) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikolar bulunur (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).

Reaktif oksijen türlerinin kimyasal modifikasyon dolayısıyla mutajenik etkili oldukları gösterilmiştir (Marnett, 2000). DNA'nın yarılması, DNA-protein çapraz bağları, purinlerin oksidasyonu gibi bazı değişiklikler reaktif oksijen türlerinin ve özellikle bunlar içinde OH^{\cdot} 'ın reaksiyonlarından dolayı olmaktadır. Eğer DNA-onarıcı sistemler tüm DNA'yı hemen yeniden oluşturamazlarsa replikasyon sırasında hatalı eşlemeden dolayı bir mutasyonla sonuçlanacaktır. Bu mekanizma oksidatif strese maruz kalmış bireylerin kansere yatkınlığını kısmen açıklayabilmektedir (Mates *et al.*, 1999). Bazı durumlarda görülen apoptozisin ROS aracılığıyla gerçekleştiği gerçeği kısmen ROS-aracılı DNA hasarına bağlı olabilir, ancak ayrıca mitokondriyal geçirgenliğin artması, sitokrom C'nin salınması, intrasellüler Ca^{2+} 'un artması ve diğer etkilere de bağlıdır (Kroemer *et al.*, 1998; Nordberg and Arner, 2001). Reaktif oksijen türlerinin mitokondriyal hasardan dolayı hücrenin ve tüm organizmanın yaşlanmasında önemli bir faktör oldukları düşünülmektedir (Beckman and Ames, 1997; Cortopassi, 1999; Nordberg and Arner, 2001). Ancak, birikmiş veriler reaktif oksijen türlerinin yaşlanmada payı olduğunu (Finkel and Holbrook, 2000) ve bunun tersine, süperoksit dismutaz ve katalaz mimetiklerinin yaşam süresini uzatabildiklerini *C. elegans*'ta göstermiştir (Melov *et al.*, 2000).

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, cilt hastalıkları, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok

hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir (Akkuş., 1995; Burtis and Ashwood, 1999; Dawn *et al.*, 1996; Tietz, 1995).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Organizmanın ürettiği serbest radikallere karşı ve normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendini koruması için sahip olduğu mekanizmalara antioksidanlar denir (Fridovich, 1999).

Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler. Canlılarda antioksidan savunma sistemi iki ana gruba ayrılır. Bunlar; metabolizmada üretilen (endojen) ve dışarıdan diyet ile alınan (ekzojen) antioksidan sistemleridir (Gülçin, 2001).

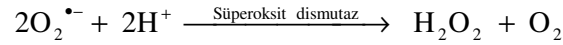
Endojen antioksidan sistemi, antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştırıcı proteazlar ve fosfolipaz gibi enzimler, yeni bileşikleri sentezleyen sistemler, glutatyon, ürik asit ve çeşitli metal bağlayıcılarından oluşmaktadır.

Tablo 3. Bazı antioksidanlar

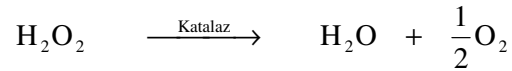
Antioksidan enzimler	Enzim yapısında olmayan antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	A Vitamini (β -Karoten)
Katalaz	C Vitamini (Askorbik asit)
Süperoksit redüktaz	E Vitamini (α -Tokoferol)
Peroksiredoksinler	Proteinler (transferin, ferritin, albumin, bilirubin)
Peroksidazlar	Hormonlar (serotonin, melatonin)
Glutatyon redüktaz	Fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoitler)
Glutatyon S-transferaz	Lipoik asit, ürik asit, glutatyon

Enzim yapısında olan endojen antioksidanlar, radikal ve reaktifleri gidererek oluşabilecek oksidatif hasarları giderirler (Fridovich, 1999). Tablo 3’de belirtildiği gibi; süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar önemli antioksidan enzimlerdir.

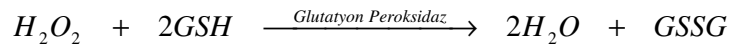
Süperoksit dismutaz enzimi, aerobik hücrelerde süperoksit radikalini ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Süperoksit dismutaz enziminin mitokondri ve sitozolde bulunan farklı türleri vardır. Mitokondride bulunan süperoksit dismutaz enzimi, Mn^{2+} ihtiva etmesi ve yüksek konsantrasyonda bulunmasından dolayı oluşan süperoksitlerin büyük çoğunluğunu gidermektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).



Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Böylece H_2O_2 ’ten Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalinin oluşumu engellenir (Halliwell, 1999).



Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllu lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesini gerçekleştirir. Bu enzim 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksiti H_2O ’ya indirgeyerek hidroksil radikalinin oluşma riskini azaltır. GSH ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir.

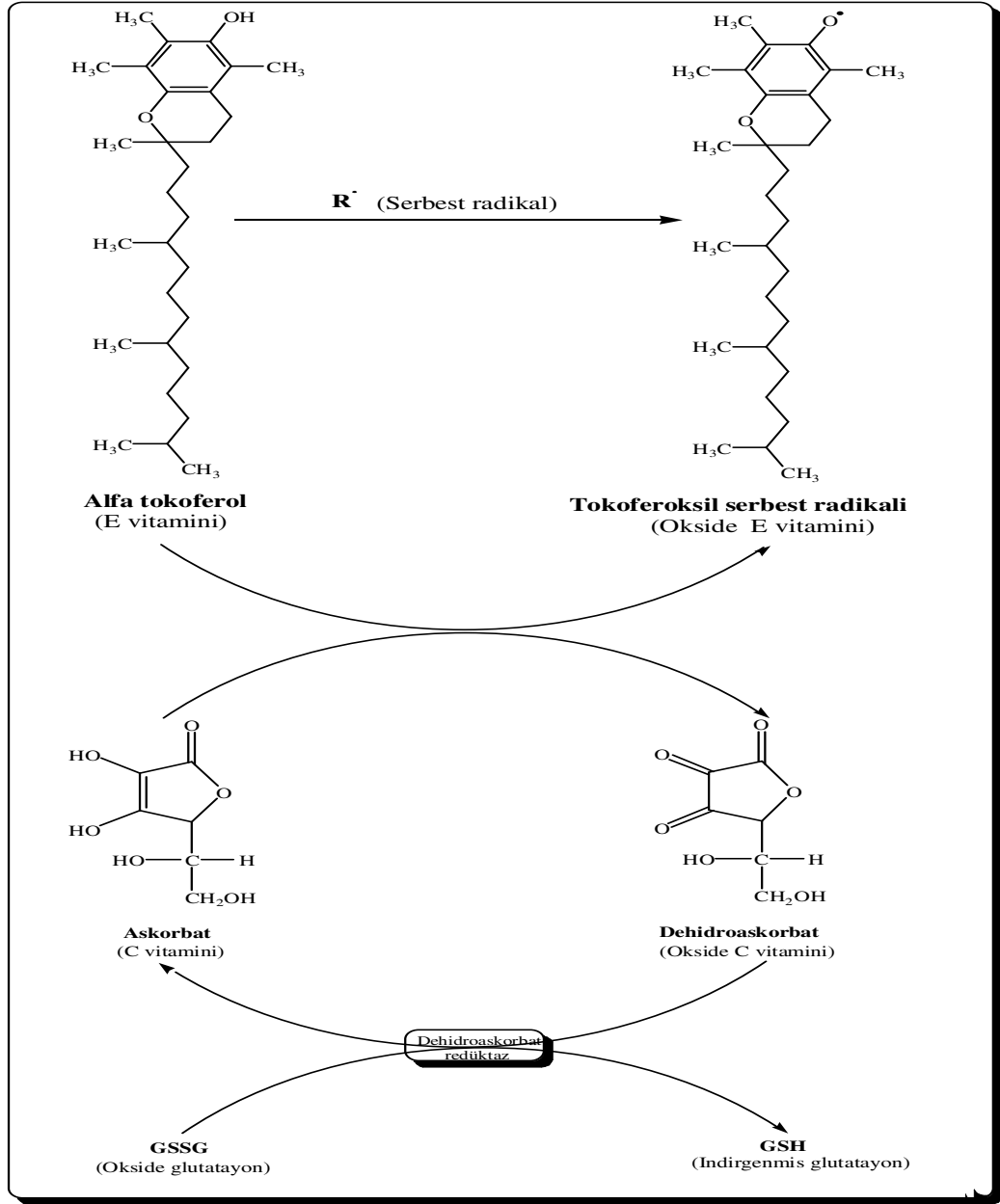


Ekzojen antioksidanlar ise doğal ve sentetik olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), β -karoten (A vitamini) ve polifenolik yapıdaki bileşikler sayılabilir. Doğal antioksidanlar en çok yeşil sebzelerde (Gülçin ve ark., 2004), tohumlarda (Gülçin,

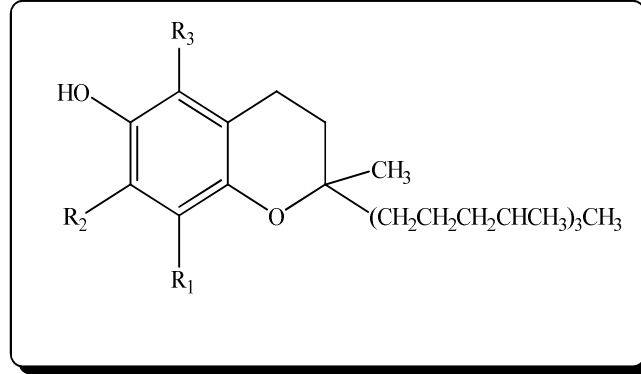
2005), baklagiller ve meyvelerde, A vitamini, C vitamini, E vitamini ve bazı B vitamini içeren besinlerde bulunur (Cao *et al.*, 1996; Gülçin ve ark., 2005a). Ayrıca sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde ve köklerde bol miktarda bulunmaktadır (Pratt *et al.*, 1990).

Doğal antioksidanlardan α - tokoferol (E vitamini), yağda çözünen önemli bir antioksidandır. Hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli işlevler görmektedir. Lipit peroksil radikalleri, diğer doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek zincirleme lipit peroksidasyon reaksiyonları oluştururlar. α -Tokoferol, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan doymamış yağ asitlerini, reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerine karşı korur. α -Tokoferol, lipit peroksil radikalleri (LOO[•]) ile tepkimeye girerek bunların reaktifliğini giderir. Böylece zincir kırıcı etki yaparak lipit peroksidasyonunu engeller (Bursal, 2009).

Ayrıca α -tokoferol lipit serbest radikallerini söndürdüktan sonra Şekil 6'da görüldüğü gibi tokoferoksil radikale dönüşmektedir. Tokoferoksil radikali ise askorbik asit tarafından tekrar yenilenir ve tekrar α -tokoferole dönüştürülmektedir.



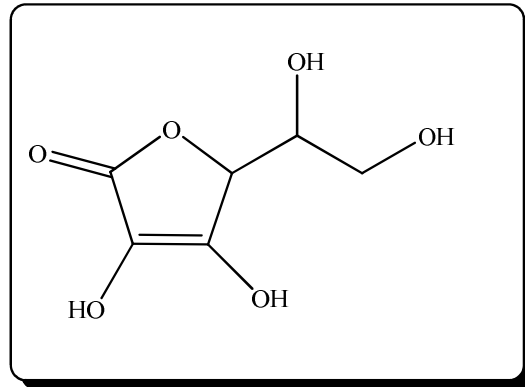
Şekil 6. α -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi (Gülçin, 2002).



α -tokoferol: R₁, R₂, R₃, CH₃
 β -tokoferol: R₁, R₃, CH₃; R₂, H
 γ -tokoferol: R₁, R₂, CH₃; R₃, H
 δ -tokoferol: R₁, CH₃; R₂, R₃, H

Şekil 7. Doğal bir antioksidan olan tokoferollerin moleküler yapıları.

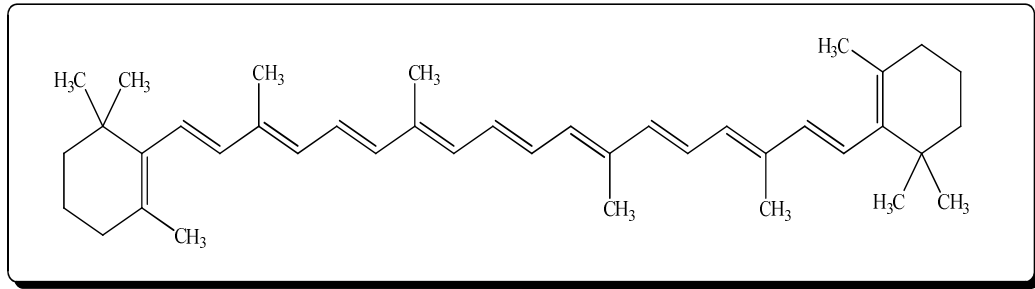
Diğer bir doğal antioksidan olan askorbik asit (C vitamini) ise suda çözünen bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikalini giderir. Askorbik asit serbest radikallerin hücre içinden uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. Bundan dolayı bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanser ve ölüm oranında düşüş meydana getirmektedir (Ames *et al.*, 1993).



Şekil 8. Doğal bir antioksidan olan askorbik asitin moleküler yapısı

Askorbik asit bitkiler ve birçok memeli tarafından karaciğerde glukozdan sentezlenir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsanda ise esansiyeldir. Askorbik asit, kolayca hidrojen atomu vererek dehidroaskorbik asite dönüşen kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Dehidroaskorbik asit de aynı zamanda antioksidan etkiye sahiptir. Besinlerin ısıtılması sırasında askorbik asit büyük ölçüde etkisini kaybetmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Arrigoni and De Tullio, 2002; Padayatty *et al.*, 2003).

Bir başka antioksidan olan beta karoten bitkilerde bulunan ve α -tokoferol gibi peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girebilen bir moleküldür. Bu sebeple lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu engelleyebilir. Ayrıca iyi bir singlet oksijen söndürücüdür (Halliwell and Gutteridge, 1989).



Şekil 9. Önemli bir doğal antioksidan olan β -karotenin moleküler yapısı.

Polifenolik bileşikler ve flavonoidler, çıkış maddeleri fenol olan, güneş ışığı yardımıyla bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde fotomorfogenez reaksiyonları sonucu oluşan organik bileşiklerdir. Suda orta derecede organik çözücülerde ise iyi çözünürler. Flavonoidler, bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Bitkilerin güneş ışığına rağmen gelişmeleri bu pigmentlerin çok fazla miktarda sentezlemesiyle mümkün olabilmektedir. İnsanlarda flavonoidler, bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır (Jung *et al.*, 2005).

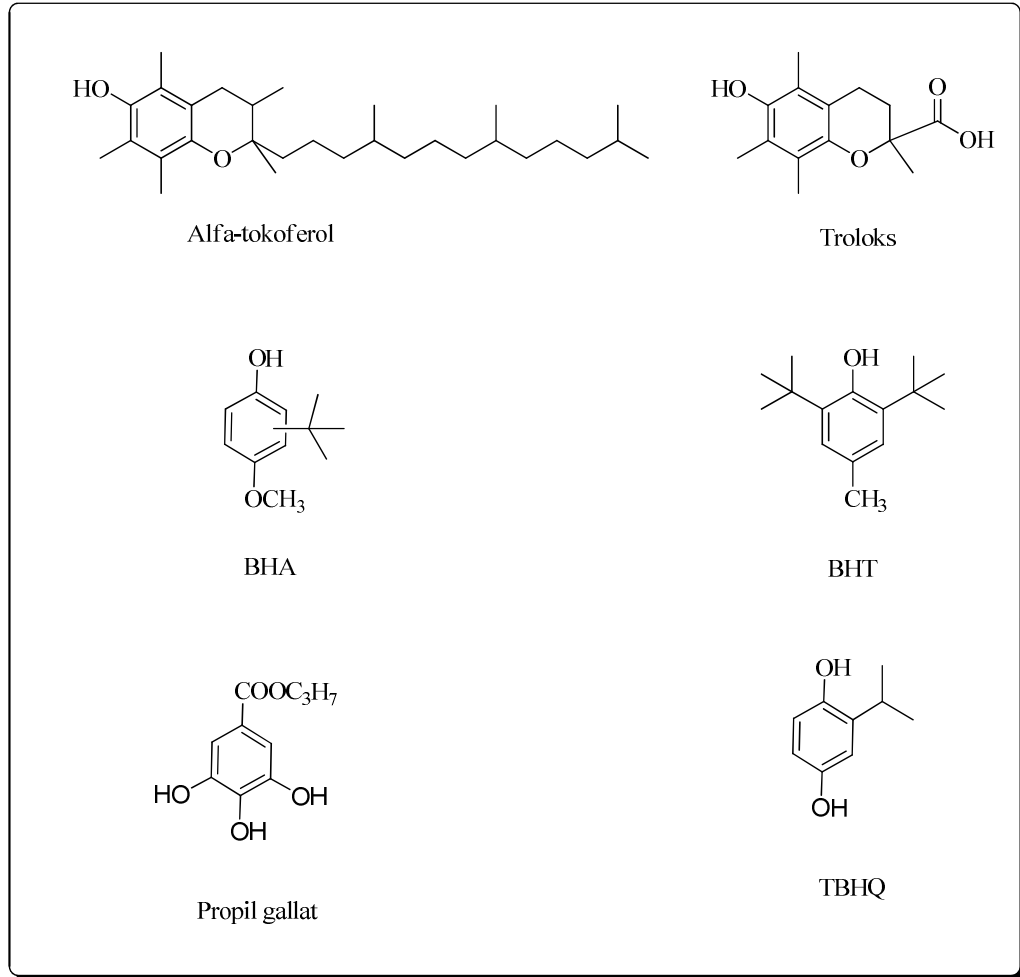
Bitki hücre ve dokularında basit fenolik bileşiklerin önemli bir kısmı, fenolik asitler ve fenilpropanoidlerin sentez yolunun son ara ürünleridir. Polifenolik bileşikler ve

flavonoitler, lipid peroksidasyonu gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini giderirler, metal iyonları şelatlarlar ve oksidasyonu azaltarak antioksidan özellik gösterirler (Stevenson and Hurst, 2007). Polifenoller, her molekülünde birden fazla fenol grubu içeren ve önemli antimikrobial, antioksidan etkiye sahip olan bileşiklerdir. Özellikle meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunurlar. Katekin, gallik asit, epikatekin, kuersetin, p-kumarik asit önemli fenolik bileşiklerdir (Trouillas *et al.*, 2003)

Tablo 4. Bazı doğal antioksidanlar ve buldukları kaynaklar

Antioksidan türü	Bulunduğu kaynaklar
Katekinler	Yeşil çay
Flavonoitler	Tahıllar, meyve ve sebzeler
Polifenoller	Meyvelerin çekirdek ve tohumları
Karotenoitler	Bitkisel yağlar
Tokoferoller	Bitkisel yağlar

Sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütihidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) ve troloks gibi maddelerdir (Köksal, 2007). Sentetik antioksidanlar gıdalarda; gıdaların oksidasyonu sonucu oluşan bozulmalar, koku oluşumu, tatların bozulması ve vitamin miktarındaki azalmaları gibi oluşan problemleri çözmeye ve bunların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalardan sonra kullanımlarına ciddi sınırlama ve yasaklar getirilmiştir (Haigh, 1986).



Şekil 10. Sıklıkla kullanılan bazı doğal ve sentetik antioksidanların açık kimyasal yapıları

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Helichrysum cinsi, dünya üzerinde yaygın dağılımı ve kimyasal içeriğinin yaygın olması ile halk arasında kullanımı yaygın bir bitki topluluğudur. Yeryüzünde; Akdeniz Bölgesi, Ön asya, Tropik Afrika, Güney Afrika, Madagaskar ve Avusturalya bölgelerinde, 500'den fazla *Helichrysum* türü bulunmaktadır (Aslan, 1994). *Helichrysum* cinsine dahil olan türler, başlıca antimikrobiyal, anti-enflamatuvvar, sindirim kolaylaştırıcı ve safra artırıcı özellikleri nedeniyle halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu türler triterpenoidler, steroidler, flavonoidler ve asetofenonları içerirler. *Helichrysum plicatum* DC. flavonoid içeren *Helichrysum* türleri içinde bu anlamda en zengin türlerden biridir. Bitki içeriğinin %4,83'ü Helichrysin A ve B, apigenin, naringenin, isoastragalın ve isosalopurposit flavonoidlerinden oluşur (Erdoğan ve ark., 2001). Türkiye'de *Helichrysum* türlerine verilen mahalli adlar kimi araştırmacıların çalışmalarında yer almaktadır. Sezik (1977) kudama çiçeği, daz çiçeği; Baytop (1984) ve Sezik vd. (1991) altın çiçeği, arı çiçeği, sarı çiçek; Baytop (1994) ölmez çiçek, solmaz çiçek, sarı çiçek isimleri ile de bilinmektedir.

Helichrysum türleri Anadolu'da halk ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Helichrysum* türlerinin genellikle infüzyon veya dekoksyonu halinde halk ilacı olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Böbrek taşlarını düşürmek amacıyla on gün boyunca yemeklerden önce bir bardak içildiği, on gün aradan sonra aynı şekilde kullanılmaya devam edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Aslan, 1994). *Helichrysum plicatum* bitkisi şeker hastalığı ve böbrek rahatsızlıklarında kullanıldığı belirtilmektedir (Aslan, 2000).

Helichrysum plicatum infüzyonu Gümüşhane civarında yara ve yanıklara karşı; Tokat ve civarında el ve ayaklardaki çatlakların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Bitkinin dekoksyon ve infüzyonunun Amasya, Osmaniye, Erdemli (Mersin), Sütçüler (Isparta), Sarıevliler (Karaman) ve Domaniç (Kütahya) civarında böbrek

taşlanına karşı, taş düşürücü, idrar artırıcı olarak kullanımı tespit edilmiştir (Aslan, 1994)



Şekil 11. *Helichrysum plicatum*

Flavonoidler, bitkilerde en yaygın raslanan ve farklı biyolojik ve farmakolojik etkiler gösteren fenolik gruplardan birisidir. Bazı bitkilerin, fenolik yapıları nedeniyle, antioksidan özellik gösterdikleri ve serbest radikal tepkimelerini durdurdukları bilinmektedir (Czinner *et al.*, 2000). *Helichrysum plicatum* DC. de flavonoid içeren zengin bir tür olduğundan antioksidan özellik gösteren bir bitkidir.

Flavon, flavonoller, flavanonlar ve kalkonlar içeren pek çok *Helichrysum* türlerinin flavonoid aglikonları da içerdiği belirtilmektedir (Wollenweber *et al.*, 1998). Bitkinin kimyasal bileşenlerinden (flavonoidler, kumarinler, esansiyel yağlar ve yağ asitleri) en önemlisi içeriğindeki flavonoidlerdir. Ham ilaçların tedavi edici etkisi muhtemelen öncelikle bu bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Czinner *et al.*, 2000)



Şekil 12. *Phlomis pungens*

Phlomis pungens L. çok yıllık, 70 cm boyunda, yıldızimsı sık tüylü, otsu bir bitkidir. Gövde yaprakları mızraksı veya yumurtamsı mızraksı tabanda karma gibi, küçük dişli veya testere dişli, nadiren düzdür. Çiçek mor veya pembe. Meralarda, nadas alanlarında, yol kenarlarında, kuru taşlı yamaçlarda yaygınlık gösterir (Serin vd., 2008). Bu bitki yöresel olarak Ayıkulağı, Calba ve Şalba olarak bilinmektedir (Baytop, 1999).

Yüz türden daha fazlasını içeren Lamiaceae Familyasının uzun ömürlü ot türü olan *Phlomis* cinsi Avrupa, Asya ve Afrika'da bulunmaktadır (Hedge, 1994). *Phlomis* türlerinin bir kısmı tıbbi alanda kullanılır. Onların basur ve ülser tedavisi için ilginç biyolojik özellikler sergilediği iddia edilir (Couladis, 2000). Bunun yanı sıra burada çeşitli antimikrobiyal özelliklerinin olduğu ve serbest radikallere karşı koruyucu özellikte olduğu bilinmektedir (Ismailoglu, 2002).

Bu cinslerin biyolojik etkilerinin bazıları fenolik ve flavonoid içeriğinden dolayı olabilir (Yuhan, 2009)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, linoleik asit, α - tokoferol, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween-20) ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich'den satın alındı. Amonyum tiyosiyanat Merck'ten satın alındı.

3.1.2. Yararlanılan malzeme, alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucu	: Sanyo, Japan
pH-metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Scaltec SBA 41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Evaporatör	: Heidolph 94200, Bioblock Scientific
Saf su cihazı	: Firstream Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	: 3 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.a. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler

1. % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 100 mL'lik balon jodede bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. Folin-Ciocalteu Reaktifi: Satın alındığı şekilde kullanılmıştır.

3.1.3.b. Toplam flavonoit miktarı tayini ile ilgili çözeltiler

1. 1 M'lık CH_3COONa çözeltisi: 8,2 g CH_3COONa alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. %10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ çözeltisi: 10 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ alınıp hacmi destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,04 M pH: 7,4 fosfat tamponu hazırlanması: 1,135 g Na_2HPO_4 alındı 180 mL destile suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı. Destile su ile toplam hacmi 200 mL'ye tamamlandı.
2. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 0,017 M'lık linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265 μL linoleik asit 50 mL ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.
3. %3,5'luk HCl çözeltisinin hazırlanması: %37'lik HCl'den 9,46 mL alınarak 100 mL'ye destile suyla tamamlandı.

4. 20 mM FeCl₂ çözeltisi hazırlanması: 281 mg FeCl₂.3/4H₂O, %3,5'luk HCl ile çözülerek hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamamlandı.
5. %30'luk NH₄SCN çözeltisinin hazırlanması: 15 g NH₄SCN saf suda çözüldü, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme kuvveti tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na₂HPO₄ yaklaşık 180 mL destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. %1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g K₃Fe(CN)₆ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 150 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. %0,1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması: 165 mg FeCl₃.6H₂O destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.e. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,01 M'lık CuCl₂ çözeltisinin hazırlanması: 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
2. 7,5x10⁻³ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 mL etanolde çözüldü.

3. 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 80 mL saf suda cözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

3.1.3.f. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili cözeltiler

1. 10^{-3} M'lık DPPH• cözeltisinin hazırlanması: 39 mg DPPH• etanolda tamamen cözününceye kadar bir gece boyunca etanolda manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin toplanması ve kurutulması

Deneylerde kullanılan *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkileri Keşiş dağı eteklerinde Erzincan'ın Çayırılı ilçesine bağlı Çilhorozu ve Sarıgüney-Bozköy köyünden temin edildi. Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Korkmaz ve öğrencileri tarafından 2979 kayıt nolu *Helichrysum plicatum* ve 2938 kayıt nolu *Phlomis pungens* toplanarak teşhis edildi. Bu toplanan bitkiler Biyoloji bölümü herbaryumunda saklanarak, toplanan numuneler daha sonra küçük parçalara ayrılıp ve oda sıcaklığında gölgede kurutulduktan sonra, kurutulmuş numuneler antioksidan ile ilgili çalışmalarda kullanılmaya kadar karanlıkta ve buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının hazırlanması

Etanol ekstresinin hazırlanması literatürde belirtildiği gibi yapıldı (Gülçin, 2005). Etanol ekstresi için blenderde öğütülmüş ve toz haline getirilmiş *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkileri 20 g numuneler 1 litrelik ağzı kapalı erlenlerde numunelerin yirmi katı etanol ile (400 mL) manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen etanol ekstraları süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzölmüş ekstralar birleştirilerek evaporatörde 40 °C'de etanol uzaklaştırıldı.

3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı FCR ile belirlendi (Singleton *et al.*, 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Bunun için önce bir standart grafik çizildi.

Bu amaçla 25 mg gallik asit 25 mL destile suda çözüldü ve 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 100-600 µg gallik asit içeren çözeltiler erlenlere aktarıldı ve hacim destile suyla 23 mL'ye tamamlandı. Erlenlere sırasıyla 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 1,5 mL ilave edildi. Karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansı 760 nm'de destile sudan oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol için numune yerine destile su kullanıldı.

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Gülçin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre değerlendirildi (Gülçin, 2005). Daha önce hazırlanan her bir stok çözeltilerden 1 mg alındı ve vezin kaplarına aktarıldı ve hacim 23 mL'ye destile suyla tamamlandı. Karışıma 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da 1,5 mL %2'lik Na₂CO₃ ilave edildi. Numuneler iki saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda numunelerin absorbansı saf sudan oluşan köre karşı 750 nm'de okundu. Bu işlemler üçer defa tekrarlandı. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalent miktarı standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla bulundu. Bulgular gallik asit ekivalent (GAE) ve mikrogram olarak verildi.

3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoit bileşik miktarı Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre belirlendi (Park vd., 1997). Standart flavonoit bileşik olarak kuarsetin kullanıldı. Bunun için önce standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg kuarsetin 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 10-50 µg kuarsetin içeren çözeltiler deney tüplerine aktarıldı. Daha sonra bunun üzerine sırasıyla 0,1 mL (1 M) suda hazırlanmış CH₃COOK ve 0,1 mL (%10) Al(NO₃)₃ çözeltilerini içeren 4,3 mL etanol çözeltisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorbansları etanolden oluşan köre karşı kaydedildi. Toplam flavonoit konsantrasyonu kuarsetinin standart

olarak kullanıldığı aşağıda verilen standart grafik denkleminde mikrogram kuarsetin ekivalent (QE) olarak hesaplandı.

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarını belirlemek için toplam fenolik bileşik miktarı tayininde kullanılan stok çözeltilerden deney tüplerine sırasıyla 1000 µg ekstre ihtiva eden stok çözelti aktarıldı. Daha sonra ise deney tüplerine aktarılan farklı miktarlardaki ekstralar 0,1 mL (1 M) suda hazırlanmış potasyum asetat ve 0,1 mL (%10) alüminyum nitrat çözeltilerini içeren 4,3 mL etanol çözeltisi ile seyreltildi ve vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm’de absorbansları aynı şekilde kaydedildi.

3.2.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Mitsuda vd. 1966). Öncelikle stok çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla 20 mg etanol ekstraları 20 mL etanolde çözünerek hazırlandı. İstenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözeltilerden vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL’ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2,5 mL tampon çözelti ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37°C’de gerçekleştirildi. Her altı saatte bir vezin kaplarından 100’er µL alındı 4,7 mL etanol bulunan deney tüplerine konuldu 100 µL Fe²⁺ çözeltisi daha sonra da 100 µL SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 4,8 mL etanol bulunan deney tüpüne 100 µL Fe²⁺ ve 100 µL SCN⁻ çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin 500 nm’deki absorbansları köre karşı okundu.

3.2.6. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Oyaizu, 1986). Taze hazırlanan stok çözeltilerden 10, 20 ve 30 $\mu g mL^{-1}$ olacak şekilde alındı ve deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] ilave edildikten sonra karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi.

Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerinede 2,5 mL destile su ve %0,1'lik 0,5 mL $FeCl_3$ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

3.2.7. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstrelerinin kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının (2006) kullandığı Kuprak metodunun hafif bir modifikasyonuna göre yapıldı. Bunu için deney tüplerine 0,01 M'lık 0,25 mL $CuCl_2$ çözeltisi ilave edildi.

Bunun üzerine 0,25 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL 1M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10–30 $\mu g/mL$) *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstreleri ve standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini göstermektedir.

3.2.8. DPPH• Serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini

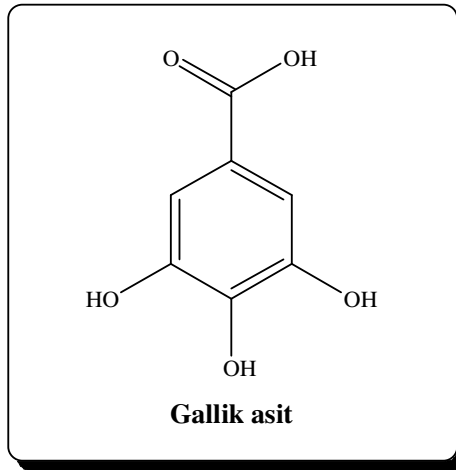
DPPH serbest radikal giderme Blois metoduna göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH•'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 mL olacak şekilde destile etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 mL ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbanları kaydedildi. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH•çözeltisi kullanıldı. Azalan absorban geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

4.1.1. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları

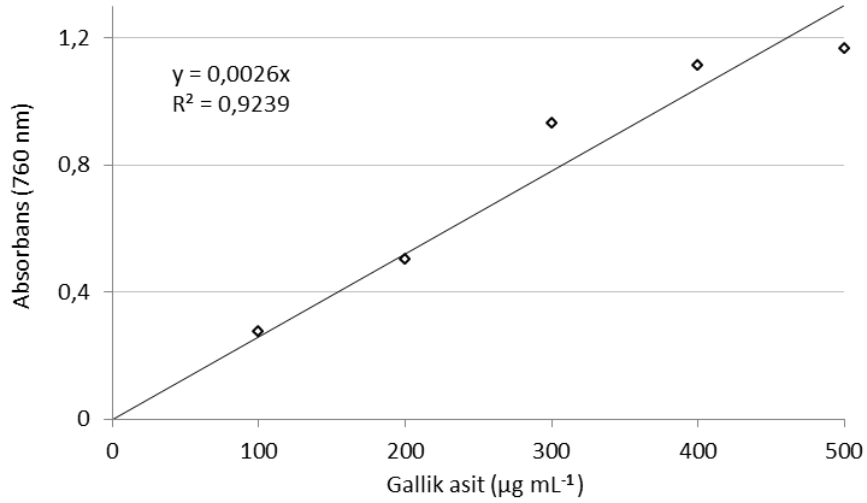
Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarını tespit için standart fenolik bileşik olarak kullanılan galik asitin açık yapısı Şekil 13.' de görülmektedir.



Şekil 13. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan galik asitin açık yapısı (Köksal, 2007).

Bunun için öncelikle galik asitten standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formülden de yine her iki ekstrada bulunan toplam fenolik bileşik miktarları galik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9239). Bu amaçla hazırlanan standart galik asit grafiği Şekil 14' de verilmiştir.

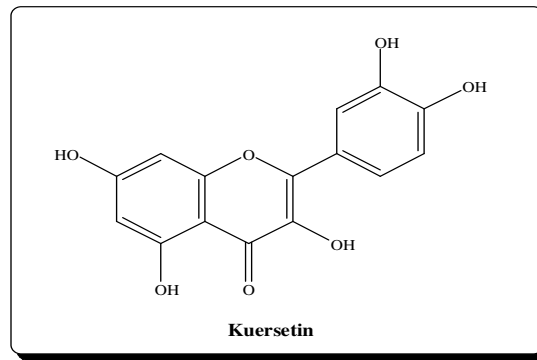
$$\text{Absorbans}_{(\lambda,760\text{nm})} = 0,0026 \times [\text{Gallik asit}]$$



Şekil 14. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için gallik asit ile hazırlanan standart grafik

4.1.2. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini bulgular

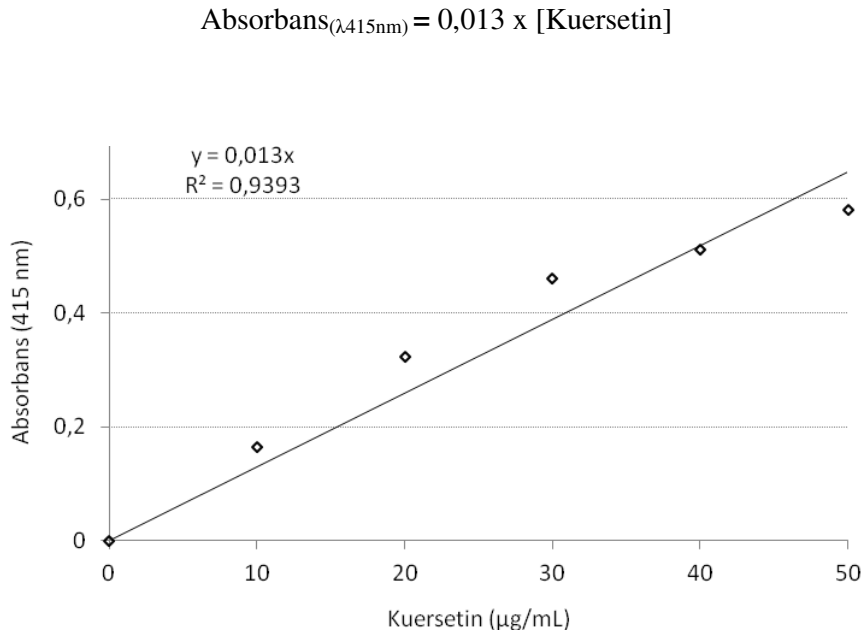
Şekil 15.' de açık yapısı verilen ve birçok çalışmada standart antioksidan olarak kullanılan kuersetin (Büyükokuroğlu vd., 2001; Gülçin, 2002; Gülçin vd., 2004) çalışmamızda standart flavonoit olarak kullanıldı (Türkoğlu vd., 2006). Flavonoidler iki fenil halaksının propan zinciri ile birleşmesinden meydana gelen difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir.



Şekil 15. Standart ve iyi bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı (Köksal, 2007).

Flavonoidler antioksidan özelliğe sahip olup, kronik kalp hastalıkları gibi birçok hastalığı önleyen önemli bir doğal bileşik grubudur. Bitkilerden elde edilen flavonoidlerin UV ışınlarını absorblayan özellikleri ve antioksidan aktivitelerinden dolayı kanser tedavisinde kemoprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Hertog *et al.*, 1995). Ayrıca flavonoidlerin lösemi (Larocca *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1994) ve yumurtalık kanseri (Benavente-Garcia *et al.*, 1997) gibi kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

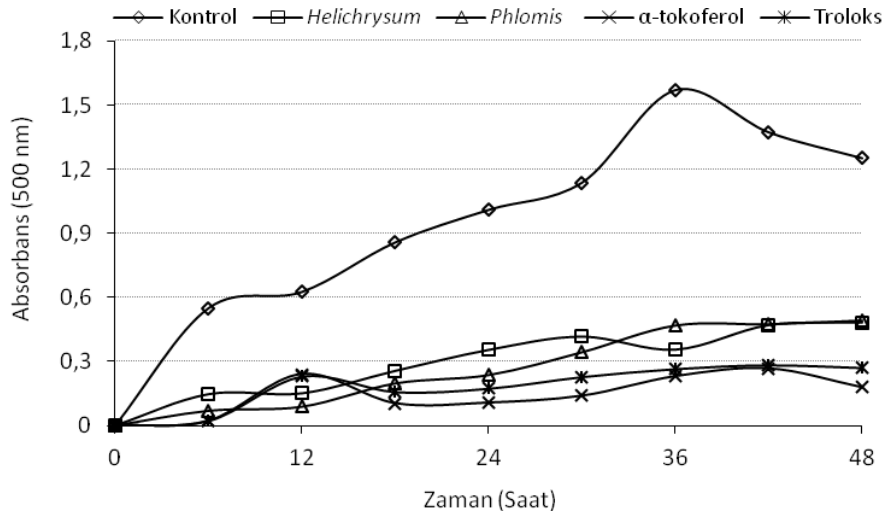
Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinden elde edilen etanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarı için öncelikle kuersetin standart olarak kullanılarak bir standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla her iki ekstrakte bulunan toplam flavonoid miktarı kuersetin ekvivalent (QE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9393). Bu amaçla hazırlanan standart galik asit grafiği Şekil 16.' de verilmiştir.



Şekil 16. 10-50 µg arasında kuersetin kullanılarak toplam flavonoid miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği

4.1.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite bulguları

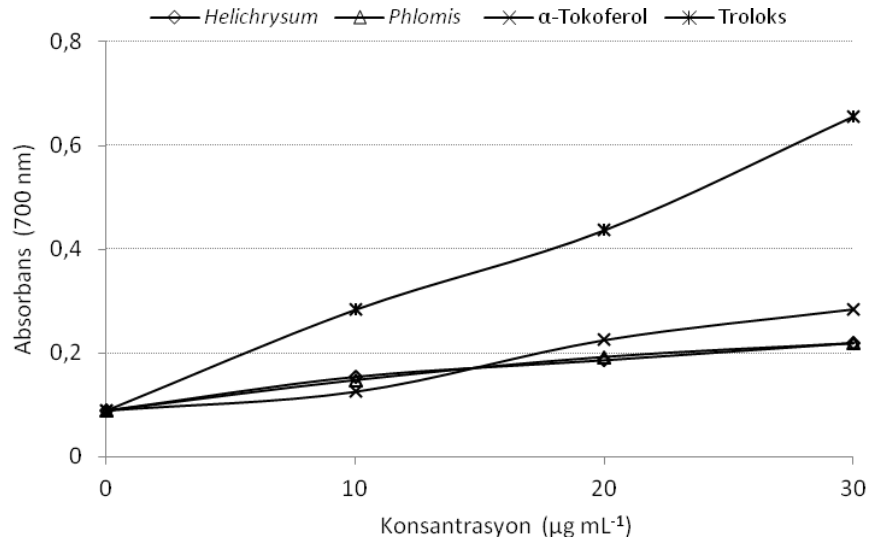
Çalışmada kullanılan *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstrelerinden antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Toplam antioksidan aktivite tayini için $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonları kullanıldı. Şekil 17.' de görüldüğü gibi *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstrelerinde antioksidan aktivitelerine bakıldığında *Helichrysum plicatum* bitkisinin standartlara yakın antioksidan aktivite gösterdiği ve toplam fenolik içeriği daha fazla olduğu için daha fazla antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 17. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstrelerinin $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ deki konsantrasyonda toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.1.4. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti ile ilgili bulgular

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin vd., 2006). Çalışmada kullanılan *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarında indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile *Helichrysum plicatum*'un doğru orantılı olarak arttığı görülürken, her iki bitkinin de demir indirgeme aktivitesinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Her iki ekstrenin indirgeme potansiyeli, farklı konsantrasyonlardaki ($10-30 \mu\text{g mL}^{-1}$) çözeltilerinin 700 nm 'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 18'den görülebileceği gibi *Phlomis pungens* ve *Helichrysum plicatum* kullanılan α -tokoferol'e yakın fakat daha az indirgeme potansiyeli göstermiştir.

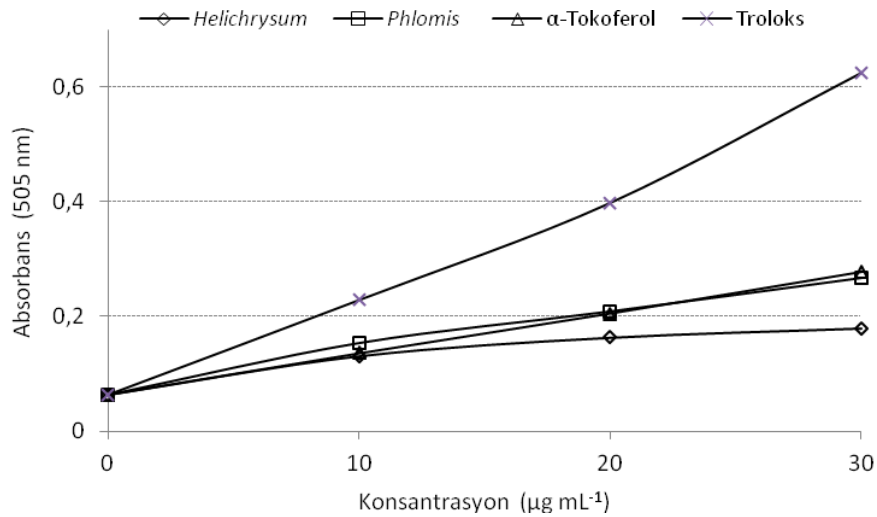


Şekil 18. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki ($10-30 \mu\text{g mL}^{-1}$) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.1.5. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti bulguları

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi ekstraların artan konsantrasyonu ile artmıştır. *Phlomis pungens*'in indirgeme gücü standart antioksidan olan α -tokoferol'e yakın *Helichrysum plicatum*'un ise indirgeme gücünün daha az ve dolayısıyla antioksidan özelliğinde daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Her iki ekstrenin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki ($10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$) çözeltilerinin 450 nm 'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 19).

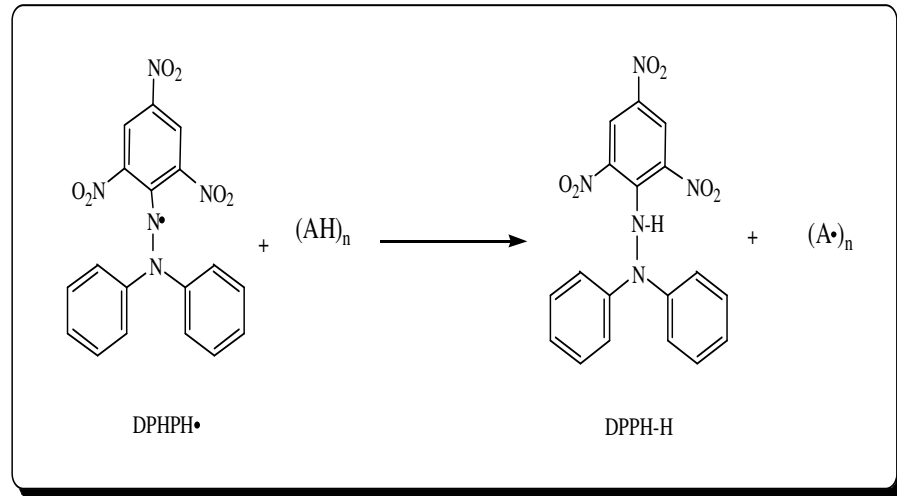


Şekil 19. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki ($10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

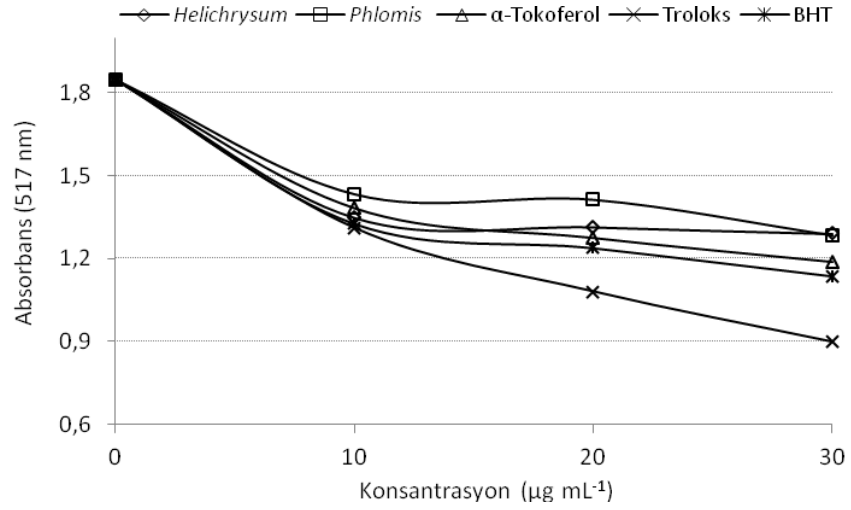
4.1.6. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin, DPPH• serbest radikalini giderme aktivitesini tesbiti için yapılan çalışmada BHT, α-tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşikleri kullanılmıştır.

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin, DPPH serbest radikalinin giderilmesinde (Şekil 20) farklı etki göstermişlerdir. DPPH serbest radikalini *Helichrysum plicatum*'un etanol ekstresi troloks hariç diğer standartlara yakın miktarda giderirken *Phlomis pungens*'in radikal giderme aktivitesinin daha az olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 20. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi (Gülçin, 2002).



Şekil 21. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlarda ($10\text{--}30 \mu\text{g mL}^{-1}$) DPPH serbest radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol, troloks ve BHT ile karşılaştırması

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstraları ile standart antioksidanlar $30 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler: *Helichrysum plicatum* %30,5, *Phlomis pungens*, %30,1, α -tokoferol %35,8, troloks %51,4. Bulgulardan da anlaşıldığı gibi *Helichrysum plicatum*'un *Phlomis pungens*'e göre daha yüksek DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediği gözlemlendi.

4.2. Tartışma

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) küpröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi. Kullanılan antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan aktiviteler kozmetik ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan α -tokoferol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks ile mukayese edildi. Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Kronik hastalıkların, DNA hasarlarının, mutasyonların, karsinogenezin azaltılması, patojenik bakteriyel gelişiminin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde serbest radiakal gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir (Zhu *et al.*, 2002).

Fenolik bileşikler özellikle flavonoidler hidroksil guruplarında bulunan hidrojenlerini kolaylıkla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalinin rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir. Lipit peroksidasyonu, gıda maddelerinin işlenmesinde ve muhafazasında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Yağlarda ve yağlı yiyeceklerde sadece yiyecekleri bozmakla kalmaz, aynı zamanda kansere, mutasyonlara ve yaşlanmaya sebep olan peroksi ($ROO\bullet$) ve hidroksi ($OH\bullet$) radikalleri ile reaktif oksijen türleri ve serbest radikalleri de meydana getirir (Yagi, 1987).

Lipitlerin oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur. Çoklu doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre hidrojen koparmasıyla oluşan radikalın çift bağın konjugasyonu ile kararlı hale getirmesi ve böylece de hidrojenin daha kolay koparılmasına sebep olmasından dolayı, otooksidasyona daha yatkındırlar (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Ferrik tiyosiyonat metoduna göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan antioksidan parameterlerden biridir. Ferrik tiyosiyonat metodu, lipit peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksitin miktarını ölçer. Bu analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asitin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Bu metodun esası, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitin spektrofotometrik olarak 500 nm’de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise Fe^{2+} ,yi Fe^{3+} e yükseltir. Daha sonra Fe^{3+} , ilave edilen tiyosiyonat ile kompleks oluşturarak 500 nm’de maksimum absorbans verir.

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin etanol ekstralarının toplam antioksidan aktivitesinde olduğu gibi indirgeme kapasitesinde de artan konsantrasyona bağlı olarak *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens*’in indirgeme kapasitesi arttığı belirlenmiştir. İlk bakışta oksidasyonun indirgeme gücü yüksek olan ekstralardan daha kuvvetli bir şekilde bastırılacağı düşünülebilir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir faktördür. Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden gidebilir. Örneğin, oksidasyonun geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir. *In vivo* olarak serbest demir ve bakırın varlığı kontrol edilebilmektedir (Meir *et al.*, 1995)..

Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+}) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şeklinde ferritin ve hemosferin proteinlerinde depolanır. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer “demir havuzu” olan ferritin ve hemosferinde depolanırlar. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarılmayan bir formda olup, seruplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell, 1994). Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde hidroksil radikali oluşur (Chevion *et al.*,

1993). Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya lizis olmuş hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Bu durum hücre ve dolayısıyla doku hasarını daha da hızlandırır. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalığı, substantia nigra'da mevcut hücrelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır. Böylece Parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır. Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigra'nın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunun yanısıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol gruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Köksal, 2007).

Son zamanlarda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla sayıda çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoit, flavonoit ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve bu bileşiklerin herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır (Kulkarni *et al.*, 2006). Sıklıkla kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin bulunmasından sonra araştırmalar tamamen bitkisel orijinli antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin vd., 2006a). Antioksidan aktivite tayin metodları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesinin araştırılması, DPPH• radikal gidermesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin, 2005; Gülçin, 2006).

Mevcut çalışmada da bu metotlar kullanıldı ve bulgular birer doğal ve standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks, BHT gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

Helichrysum plicatum ve *Phlomis pungens* bitkilerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan metodların çoğunda bitkinin *Helichrysum plicatum*'un standart antioksidan olarak kullanılan bileşiklere yakın aktivite gösterdiği fakat *Phlomis pungens*'in ise standart bileşiklere göre daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca bitkilerin yapısında bulunan fenolik ve flavonoid bileşiklerinin miktarları total olarak tespit edilmiş ve elde edilen sonuçların antioksidan aktivite tayin sonuçları ile önemli bir korelasyon içerisinde olduğu görülmüştür.

Bitkilerden *Helichrysum plicatum*'un *Phlomis pungens*'e göre daha fazla fenolik ve flavonoid bileşik içermekte ve bunun bir sonucu olarakda *Phlomis pungens*'e oranla daha fazla ve standart bileşiklere yakın değerlerde antioksidan aktivite göstermektedir.

Bu çalışmamızın bitkilerin antioksidan özelliklerinin incelenmesi araştırmalarında yararlanılacak bir çalışma olduğu muhtemeldir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmamızda iyon indirgeme kapasitesi, toplam antioksidan aktivite kapasitesi, DPPH serbest radikali giderme kapasitesi, toplama fenolik ve flavonoit miktarı gibi tesbitler yapılmıştır.

Tablo 5. *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* Bitkilerinin etanol ekstralarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarının ekivalent olarak miktarları

	Toplam fenolik bileşik ($\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ ekstre)	Total flavonoid miktarı ($\mu\text{g QE mg}^{-1}$ ekstre)
<i>Helichrysum plicatum</i>	74,4	6,3
<i>Phlomis pungens</i>	68,4	4,9

Elde edilen bulgulardan *Helichrysum plicatum* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin farklı antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bitkilerinin antioksidan aktivitesi mukayese edildiğinde toplam fenolik bileşik miktar tayini ve toplam flavonoit miktarı tayinine göre *Helichrysum plicatum*'un daha fazla fenolik ve flavonoit içerdiği Tablo 5'te görülmektedir. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite *Helichrysum plicatum*'da daha fazla olduğu bulundu. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi tayini, ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini ve kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile de yine genelde *Helichrysum plicatum* 'un daha iyi bir antioksidan özellik sergilediği belirlendi. Bu bitkilerin α -tokoferol, troloks ve BHT gibi referanslarla mukayesesi yapıldı.

6. KAYNAKLAR

Ak, T. Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi., *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum (2006).

Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, *Mimoza Yayınları*, Konya (1995).

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hogen, T.M.,. Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Disease of Ageing. *Proceedings of National Academy of Sciences Usa*, 90, 7915-7922 (1993).

Andrew, P.J., Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.*, 15: 521-531 (1999).

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir S.E., Erça E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292–304, (2006).

Aruoma, O.I. and Cuppett, s.I., Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. *AOCS pres*, Champaign, Illinois, p. 241(1997).

Aslan, M., Şeker hastalığına karşı halkilacı olarak kullanılan bitkiler üzerinde Farmakognozok Araştırmalar, Doktora tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü farmakognozok Anabilimdalı*, Ankara, 216s (2000).

Aslan, M., Helichrysum plicatum DC. Plicatum üzerinde farmakognozok Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü farmakognozok Anabilimdalı*, Ankara, 65s (1994).

Baytop, T., Türkiyede Bitkilerle Tedavi, *Nobel Tıp Kitapevi*, İstanbul, (1999).

Beckham, J.S., Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 271: c1424-c1437 (1996).

Benavente-Garcia, O., Casillo, O., Marin, F., Ortuno, A. and Del-Rio, J., “Uses and properties of citrus flavonoids”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505– 4515, (1997).

Bursal E., “Kivi Meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) Antioksidan ve Antiradikal Aktivitelerinin Belirlenmesi, Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 6-9 (2009).

Burtis C.A., Ashwood E.R., Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, *Philadelphia*, Pennsylvania. (1999).

Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., “In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium”, *Pharmacological Research*, 44, 491–495, (2001).
Cao, G.H., Sofic, E., Prior, R.L. Antioxidant capacity of tea and common vegetable. *J. Agric. Food. Chem.*, 44: 3426–3431. (1996).

Cerrutti, P.A., *Pro-Oxidant States and Tumor Activation Science*. 38, 425-456 (1985)

Cheeseman, K.H., Lipit Peroxidation and Cancer in DNA and Free Radicals, Edited by halliwell and O.L aruoma pp. 109-144, *Ellis Horwood*, London (1993).

Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhshtein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N., “Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible productive criteria for tissue injury”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 1102–1106, (1993).

Couladis, M., Tanimanidis, A., Tzakou, O., Chinou, I.B., Harvala, C., Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: Chemical composition and antimicrobial activity, *Planta Med.*669, 670-672 (2000).

Czinner, E., Hagymasi, K., Blazovics, A., Kery, A., Szöke, E. and Lemberkovics, E., in vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Journal of Ethnopharmacology*, 73,437-443 (2000).

Çavdar C, Sifil A, Çamsar. T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*;3-4: 92-95. (1997).

Dawn B. M., Allan D. M., Colleen M. S., Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, *Maryland* (1996).

De Whalley, C., Rankin, S.M., Houlst, J.R.S., Jessup, W. And Leake, D.S., , Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages, *Biochem. Pharm.*, 39 (11):1743-1750. (1990).

Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M. Stahl, W. And Vina-Ribes, J., Functional food science and defence against reactive oxidative species, *Brit. J. Nutr.*, 80 suppl.1: s77-s112 (1998).

Erdoğrul, O.T., Cakıroğlu, E. and Karaman, S., Antibacterial activities of Helichrysum plicatum subs. Plicatum extract, *The science*, 1,(3), 176-17 (2001).

Esterbauer, H., Janusz, G., Pulh, H. and Jurgens, G.,. The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants Inantioxidative Modification of LDL. *Free Radicals Biol. Med.*, 13, 341-390 (1992)

Fantel, A.G., Reactive oxygen species in developmental toxicity: *Review and hypothesis*. Teratology, 53, 96-217 (1996).

Finkel, T., Holbrook, N.J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239–247(2000).

Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 893: 13-18. (1999).

Griffith, O.W., Stuehr, D.J. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.*, 57: 707-736 (1995).

Gülçin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (Chionanthus virginicus L.). *European Food Research and Technology*, 223, 759-767 (2006).

Gülçin, I., Isrgan otunun (Urtica dioica) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve baz. in vivo etkilerinin incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s114. (2002).

Gülçin, İ., “The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499, (2005a).

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34, 193-202, (2005).

Gülçin, I., Köksal E., Elmastas, M., Aboul-Enein H.Y.. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. KOCH var. joannis. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 372-382. (2007).

Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R.. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: a-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Medica*, 70, 561-563. (2004a).

Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber, *Phytomedicine*, 13, 343-351. (2006a).

Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., “Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.)”, *Food Chemistry*, 87, 393–400, (2004).

Gündüç, N., Düşük yoğunluklu lipoprotein (LPL) oksidasyonu üzerine toplam fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin in vitro ko_ullarda saptanmas., Doktora, *Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi*. (2000).

Haigh, R., Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1031-1036. (1986).

Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10-13 (2000).

Halliwell, B. And Gutteridge, J. M. C., Free radicals in biology and medicine., *Clarendon Press Oxford Antioxidants: A Per. View. Nutr. Rev.*, 52, 253-265 (1989).

Halliwell, B. Antioxidants and human diseases: a general introduction. *Nutr. Rev.*, 55: s44-s52 (1997).

Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.*, 31: 261-272. (1999).

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, 543, Oxford, (1989).

Hedge, I.C., Li, X.W., Phlomis, in Raven(Eds), Flora of china, *science Press*, p.143, (1994)

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. And Van de putte, B., , Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices, *J. Agr. Food Chem.*, 41: 1242-1246 (1993).

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Lipoprotein, Antioxidant Protection, and Atherosclerosis, *Adv. Pharmacol.*, 38, 425-456

Hoffman, R.M. And Garewal, H.S., Antioxidants and the prevention of coronary heart disease, *Arch. Intern. Med.*, 155: 241-246. (1995).

Ismailoglu, U.B., Saracoglu, U.S., Haput, I., Sahin-Erdeli, Effect of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radicalinduced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings, *J. Ethnopharmacol.* 79, 193-197 (2002).

Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. And Kinsella , J.E., Naturel antioxidants in grapes and wines, *J. Agr. Food Chem.*, 42: 64-69 (1994).

Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, Erzurum (2000)

Köksal, E., Purification and characterisation of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) and determination of their antioxidant and antiradical activities. PhD Thesis, *Atatürk University, Erzurum*, Turkey (2007).

Köksal, E., “Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi” *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*. Erzurum (2007).

Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. physiol.*, 60: 619-642. (1998).

Langseth, L., , Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention, ILSI (International Life Sciences Institute), **Brussels**, Belgium, p.24. (1995).

Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti-Panici, P., Scambia, G., Mancuso, S., Capelli, A., Ranelletti, F., “Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids”, **British Journal of Hematology**, 75, 489–495, (1990).

Lowenstein, C.J., Snyder, S.H. Nitric oxide, a novel biological messenger. **Cell**,70: 705-707 (1992).

Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, 21: 361-370. (2000).

Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez De Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, 32: 595-603. (1999).

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P, “Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves”, **Journal Agricultural Food Chemistry**, 43, 1813-1819, (1995).

Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., Lithgow, G.J. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. **Science**, 289: 1567-1569. (2000).

Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwami K., “Antioxidativ action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid”, **Eiyoto Shokuryo**, 19, 210–214, (1966).

Nordberg, J., Arner, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, **Free Radical Biology and Medicine**, 31: 1287-1312 (2001)

Oyaizu, M. “Anti-oksidade activities of products of browning reactions prepared from glucosamine”, **Japanese Journal of Nutrition**, 44, 307-315, (1986).

Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., “Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil” **Arquivos de Biologiae Tecnologia**, 40, 97–106, (1997).

Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants: Hudson B.J.F. ED: *Elsevier*: Amsterdam, 17-192 (1990).

Radi, R., Pelufo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 30: 463-488 (2001).

Rubbo, H., Radi, R., Anselmi, D., Kirk, M., Barnes, S., Butler, J., Eiserich, J.P., Freeman, B.A. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J. Biol. Chem.*, 275: 10812-10818 (2000).

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. And Sauro-Calixto, F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agr.*, 76: 270-276 (1998).

Saran, M., Bors, W., Signalling by O₂ and NO: How far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? *Chem. Biol.Interact.*, 90: 35-45 (1994).

Singleton, V.L., Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178 (1999).

Tietz N. W., Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. *Philadelphia*, Pennsylvania (1995).

Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study", *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386, (1995).

Türkoğlu A., Duru M.E., Mercan, N., Kivrak İ., Gezer, K., "Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill", *Food Chemistry*, 267-273, (2006).

Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M. And Jong, J, Flavonoids are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease, *J. Agr. Food Chem.*, 43: 2800-2802 (1995).

Yagi, K., "Lipid peroxides and human disease", *Chemistry Lipids*, 45, 337-341, (1987).

Yen, G.C. And Chen, H.Y., Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J. Agr. Food Chem.*, 43 (1): 27-32. (1995).

Zhu, Q.Y., Hackman R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., "Antioxidative activities of along tea", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6929-6934, (2002).

Zhang, Y., Wang. Z.Z., Phenolic composition and antioksidant activites of two phlomis species, *C.R. Biologies*, 332, 816-826 (2009).

Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G. And Maxwell, S.R.J., Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Anal. Chim. Acta.*, 266:265-277. (1992).

Wollenweber, E., Stevens, J.F. and Ivancic , M., Flavonoid Aglycones and a thiophene derivative from *Helichrysum cassianum*, *Phytochemistry*, 47, 1441-1443 (1998).

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Giresun'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Giresun'da tamamladı. İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen kimya anabilim dalın da yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.