

**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ENDEMİK BİTKİ TÜRLERİNİN FARKLI EKSTRAKTLARININ  
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özlem KÖK**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**AĞUSTOS 2022**



**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ENDEMİK BİTKİ TÜRLERİNİN FARKLI EKSTRAKTLARININ  
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özlem KÖK  
(180811201)**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Buğrahan EMSEN  
Eş Danışman: Doç. Dr. Burak SÜR MEN**

**AĞUSTOS 2022**



## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Özlem KÖK**



## ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince ve bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde bilgilerinden yararlandığım, çalışmalarında destek ve güvenini hissettiğim, yardımını, sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, değerli zamanını ve bilgilerini benimle paylaşan öğrencisi olmaktan ve onunla çalışmaktan onur duyduğum kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Buğrahan EMSEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Aynı laboratuvarı paylaştığım, deneysel çalışmalarım ve eğitimim süresince bana yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Burak SÜRME'ne bilgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında yanımda olan maddi ve manevi olarak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen eğitim hayatım boyunca hep arkamda duran kıymetli aileme, hayat yolunda bana ilham veren sevgisini ve desteğini daima hissettiğim hayat arkadaşım Reha Onur KÖK'e sonsuz teşekkürler.

Bana anneliği tattıran meleklerim Nursema ve Esmenur'a teşekkür ederim.

Ağustos 2022

Özlem KÖK



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
KISALTMALAR .....	xi
SEMBOLLER .....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
ABSTRACT .....	xxi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>5</b>
2.1 Kuramsal Temeller .....	5
2.1.1 Serbest radikaller .....	5
2.1.2 Antioksidanlar.....	6
2.1.2.1 Enzimatik antioksidanlar.....	8
2.1.2.2 Nonenzimatik antioksidanlar .....	9
2.1.3 Fenolik bileşikler .....	9
2.1.4 Flavonoidler .....	10
2.1.5 Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	11
2.1.5.1 DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi .....	12
2.1.5.2 Metal şelatlama aktivitesi.....	13
2.1.5.3 Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi .....	13
2.1.5.4 Toplam flavonoid içeriğin belirlenmesi .....	14
2.1.5.5 HPLC analizi ile antioksidan etkinin ölçülmesi.....	15
2.2 Kaynak Araştırması .....	16
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>23</b>
3.1 Kullanılan Bitki Örnekleri.....	23
3.2 Bitkilerin Ekstraksiyon Süreci.....	23
3.3 HPLC Analizi ile Bazı Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması ve Miktar Tayini .	25
3.4 Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi .....	26
3.5 Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi .....	26
3.6 DPPH Üzerinden Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi.....	26
3.7 Metal Şelatlama Aktivitesi .....	27
3.8 Hücre Kültürlerinin Hazırlanması .....	27
3.9 Sitotoksikite Analizleri .....	28
3.10 Verilerin Analizi.....	29
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>31</b>
4.1 HPLC Analizi ile Bazı Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması ve Miktar Tayini .	31
4.2 Ekstraktların Antioksidan İçerik Analizleri.....	33
4.3 Ekstraktların DPPH Yakalama Aktiviteleri.....	35
4.4 Ekstraktların Metal Şelatlama Aktiviteleri.....	39
4.5 Hücrelerde Canlılık Oranının Belirlenmesi.....	43

<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>55</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>63</b>



## KISALTMALAR

<b>ABTS</b>	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
<b>ATME</b>	: <i>Astragalus tokatensis</i> 'ten elde edilen metanol ekstraktı
<b>ATSE</b>	: <i>Astragalus tokatensis</i> 'ten elde edilen su ekstraktı
<b>BHT</b>	: Bütilendirilmiş hidroksi toluen
<b>CUPRAC</b>	: Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
<b>DMEM</b>	: Dulbecco'nun modifiye eagle medyumu
<b>DPPH</b>	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>FBS</b>	: Fetal bovin serum
<b>FRAP</b>	: Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>HNME</b>	: <i>Helichrysum noeanum</i> 'dan elde edilen metanol ekstraktı
<b>HNSE</b>	: <i>Helichrysum noeanum</i> 'dan elde edilen su ekstraktı
<b>HPLC</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Medyan inhibitör konsantrasyonu
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>MİK</b>	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
<b>ORAC</b>	: Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi
<b>SHME</b>	: <i>Stachys huber-morathii</i> 'den elde edilen metanol ekstraktı
<b>SHSE</b>	: <i>Stachys huber-morathii</i> 'den elde edilen su ekstraktı
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TAK</b>	: Toplam antioksidan kapasite
<b>TEAC</b>	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi
<b>XTT</b>	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid



## SEMBOLLER

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>g</b>	: Gram
<b>L</b>	: Litre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>N</b>	: Normalite
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>pH</b>	: Hidrojen yoğunluğu
<b>v/v</b>	: Hacimce yüzde
<b>w/v</b>	: Hacimde ağırlıkça yüzde



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 3.1:</b> Bitkilerden elde edilen ekstraktların verim oranları .....	<b>24</b>
<b>Çizelge 4.1:</b> Test edilen bitki ekstraktlarının farklı fenolik bileşik miktarları .....	<b>31</b>
<b>Çizelge 4.2:</b> Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoid içerikleri.....	<b>33</b>
<b>Çizelge 4.3:</b> Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarına ait DPPH yakalama aktiviteleri için IC <sub>50</sub> değerleri .....	<b>38</b>
<b>Çizelge 4.4:</b> Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarına ait metal şelatlama aktiviteleri için IC <sub>50</sub> değerleri .....	<b>42</b>
<b>Çizelge 4.5:</b> Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktları ile muamele edilen MCF-7 hücreleri için tespit edilen IC <sub>50</sub> değerleri .....	<b>46</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Kararlı radikal DPPH indirgenmesi.....	12
Şekil 2.2: Antioksidan ve fenolik bileşik olan standart gallik asit açık formülü .....	14
Şekil 2.3: Flavonoid halkası.....	15
Şekil 2.4: HPLC analiz sistemi .....	16
Şekil 3.1: Ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği Soxhlet ekstraktörü .....	24
Şekil 3.2: Ekstraktların yoğunlaştırılma işleminin gerçekleştirildiği döner buharlaştırıcı .....	25
Şekil 3.3: Spektrofotometrik ölçümlerin gerçekleştirildiği mikropilok okuyucu .....	28
Şekil 4.1: Bitkilerden elde edilen ekstraktlar üzerinde 254 nm dalga boyundaki ölçümler sonucu ortaya çıkan HPLC kromatogramları.....	32
Şekil 4.2: Toplam fenol içerik hesaplamasında standart olarak kullanılan gallik aside ait ve toplam flavonoid içerik hesaplamasında standart olarak kullanılan kuersetine ait lineer regresyon grafikleri. ....	34
Şekil 4.3: Bitkilerden elde edilen ekstraktlara ait DPPH yakalama aktiviteleri .....	37
Şekil 4.4: Bitki ekstraktlarının DPPH yakalama aktiviteleri için IC <sub>50</sub> değerleri temel alınarak oluşturulan ısı haritası ve dendrogram.....	38
Şekil 4.5: Bitkilerden elde edilen ekstraktlara ait metal şelatlama aktiviteleri.....	41
Şekil 4.6: Bitki ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri için IC <sub>50</sub> değerleri temel alınarak oluşturulan ısı haritası ve dendrogram.....	42
Şekil 4.7: Bitkilerden elde edilen ekstraktlar ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde canlılık oranları.....	45
Şekil 4.8: Bitki ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri için IC <sub>50</sub> değerleri temel alınarak oluşturulan ısı haritası ve dendrogram.....	46
Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının yüzde DPPH, metal şelatlama ve sitotoksik aktivitelerinin ısı haritası.....	47



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAZI ENDEMİK BİTKİ TÜRLERİNİN FARKLI EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Özlem KÖK

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Buğrahan EMSEN  
Eş Danışman: Doç. Dr. Burak SÜRME

Ağustos, 2022, 63 sayfa

Mevcut tez çalışmasında, Türkiye'deki endemik bitki türlerinden *Astragalus tokatensis* Fisch., *Helichrysum noeanum* Boiss. ve *Stachys huber-morathii* R. Bhattacharjee'nin antioksidan ve sitotoksik aktivite potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, metanol ve su ekstraktları elde edilen bitkilerin yapılarındaki gallik asit ve protokateşik asit fenoliklerinin miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi aracılığı ile belirlenmiştir. Ayrıca, toplam fenol ve flavonoid içerikleri tespit edilen ekstraktların 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yakalama ve metal şelatlama aktiviteleri ölçülmüştür. Ek olarak, ekstraktların sitotoksik etkinlikleri insan meme kanser hücreleri (MCF-7) üzerinde değerlendirilmiştir. Ekstraktlardaki gallik asit ve protokateşik asit miktarları incelendiğinde, en yüksek oranlar (sırasıyla 2469,16 µg/g ve 128,87 µg/g) *S. huber-morathii*'nin su ekstraktında tespit edilmiştir. Toplam fenol içeriği analizinde, *S. huber-morathii*'nin su ekstraktı 116,34 µg gallik asit eşdeğeri/mg ekstrakt ile en yüksek değere sahip olmuştur. En fazla toplam flavonoid içeriği (83,39 µg kuersetin eşdeğeri/mg ekstrakt) *H. noeanum*'un su ekstraktında belirlenmiştir. Ekstraktların DPPH yakalama ve metal şelatlama aktiviteleri göz önüne alındığında, en düşük medyan inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) değerleri sırasıyla *H. noeanum*'un (33,13 mg/L) ve *S. huber-morathii*'nin (49,00 mg/L) su ekstraktlarında tespit edilmiştir. MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteler incelendiğinde, *H. noeanum*'un su ekstraktı en düşük IC<sub>50</sub> değeri (96,94 mg/L) ile ön plana çıkmıştır. Sonuç olarak, tez kapsamında ele alınan endemik bitkilerden özellikle *H. noeanum* ve *S. huber-morathii*'den elde edilen su ekstraktlarının yüksek antioksidan ve sitotoksik kapasiteleri sayesinde tamamlayıcı tedavi alanına katkı sağlayabilecek potansiyelde olabilecekleri düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Endemik, antioksidan, fitokimyasal, sitotoksikite



## ABSTRACT

Ms Thesis

### INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DIFFERENT EXTRACTS OF SOME ENDEMIC PLANT SPECIES

Özlem KÖK

Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Buğrahan EMSEN  
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burak SÜRMEK

June, 2022, 63 pages

In the present thesis, the antioxidant and cytotoxic activity potentials of *Astragalus tokatensis* Fisch., *Helichrysum noeanum* Boiss. and *Stachys huber-morathii* R. Bhattacharjee, which are endemic plant species in Turkey, were evaluated. In this context, the amount of gallic acid and protocatechuic acid phenolics in the structures of plants from which methanol and water extracts were obtained were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. In addition, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) capture and metal chelating activities of the extracts whose total phenol and flavonoid contents were determined were measured. In addition, the cytotoxic activities of the extracts were evaluated on human breast cancer cells (MCF-7). When the amounts of gallic acid and protocatechuic acid in the extracts were examined, the highest rates (2469.16 µg/g and 128.87 µg/g, respectively) were determined in the water extract of *S. huber-morathii*. In the analysis of total phenol content, the water extract of *S. huber-morathii* had the highest value with 116.34 µg gallic acid equivalent/mg extract. The highest total flavonoid content (83.39 µg quercetin equivalent/mg extract) was determined in the water extract of *H. noeanum*. Considering the DPPH capture and metal chelating activities of the extracts, the lowest median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were determined in the water extracts of *H. noeanum* (33.13 mg/L) and *S. huber-morathii* (49.00 mg/L), respectively. When cytotoxic activities on MCF-7 cells were examined, the water extract of *H. noeanum* stood out with the lowest IC<sub>50</sub> value (96.94 mg/L). As a result, it is thought that water extracts obtained from endemic plants, especially *H. noeanum* ve *S. huber-morathii*, which are discussed within the scope of the thesis, may have the potential to contribute to the field of complementary therapy thanks to their high antioxidant and cytotoxic capacities.

**Keywords:** Endemic, antioxidant, phytochemical, cytotoxicity



## 1. GİRİŞ

Toprak, iklim, coğrafi konum ve jeomorfolojik özelliklerinden dolayı zengin bir floristik yapıya sahip olan Türkiye’de teşhis edilen bitki türü yaklaşık olarak 11.707 civarındadır. Bu bitkilerin birçoğu lokalize olmuş endemik türler olarak karşımıza çıkmaktadır (Ulçay ve Şenel, 2020). Endemik, Latince endemos (yerli) kelimesinden gelmektedir. Endemik tür, bulunduğu bölgenin ekolojik şartlarına uyumlu yalnızca lokal bir bölgede yetişen, yöreye özgü, yerli tür olarak tanımlanabilir. Günümüzde hali hazırda bulunan endemik bitkilerin bir çoğunun biyolojik aktiviteleri saptanmamıştır. Bölgeye özgü endemiklerin ise fitokimyasal içerikleri araştırılırken türün devamlılığına dikkat edilmektedir (Karaoğlu, 2019).

Bitkiler, insanlık tarihinin en eski çağlarından itibaren tedavi edici özellikleriyle ön plandadır. Günümüzde ise birçok ülkede temel sağlık kaynaklarına bakıldığında bitkisel ürünler göze çarpılmaktadır. Dünya nüfusunun %80’inin hali hazırda geleneksel yönlemlere ve materyallere bağlı ilerlediği görülmüştür (M. S. Koçak, 2015). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de florada bulunan bitkiler tedavi, gıda, boya, insektisit, reçine, zambak, kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanları göz önüne alındığında ülkemizdeki endemik bitkilerin içeriklerinin araştırılıp literatüre kazandırılması önem taşımaktadır (M. Koçak, 2021).

Bitkilerin farmasötik özellikleri; biyoloji, kimya, farmakoloji, toksoloji gibi disiplinlerin gelişmesi ve disiplinler arası çalışmalar sonucu saptanabilmektedir (M. S. Koçak, 2015). Bitkilerin sahip olduğu metabolitler ve biyolojik aktivite tayinleri ile sentetik oluşuma gerek kalmayacak şekilde tedavi edici ajanlar geliştirilebilmektedir. Canlılar yaşamını devam ettirmek için enerji döngüsüne ihtiyaç duyarlar. Fizyolojik reaksiyonlar neticesinde dahi çeşitli radikaller oluşur ve bu oluşumlara çevresel etkenler ve patolojik reaksiyonlar eklenince oluşan radikal sayısı ve çeşidi artmaktadır. Eşleşmemiş elektronlar ise oldukça reaktif olup hücre içindeki DNA, protein, lipit gibi makromoleküllere zarar vermektedir. Serbest radikaller vücudumuzda süperoksit dismutaz vb. enzimler ile ortadan kaldırılmaktadır. Ancak bazen serbest radikal inhibisyonu yapan bu enzimler kalıtsal

olarak hasarlanır veya yaşlanmaya bağı aktivitesi azalır ise radikaller hücre ölümlerine ya da kontrolsüz çoğalmalarına neden olmaktadır (Zanbak, 2019).

Bitkilerde bulunan antioksidanlar içerisinde fenolik bileşikler ve flavonoidler önemli yer tutmaktadır. Fenolik bileşikler bitki-toprak sisteminde önemli olan sekonder metabolitlerdendir. Bu bileşikler allelopatik etkileri sayesinde bulunduğu bitkiye fayda sağlamaktadır (Azırak, 2007). Flavonoidler ise iki fenil halkasını propan zinciri birleşiminden meydana gelen difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir. Flavonoidlere örnek olarak güçlü antioksidanlardan kuersetin, luteolin, mirisetin verilebilir (Zanbak, 2019). Ayrıca flavonoidler reaktif oksijen ve azot türlerinin inhibisyonunda da işlevseldirler. Mitokondriyal süksinoksidaz, NADH-oksidaz gibi redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin konfigürasyonlarında da flavonoidler önemli rol üstlenirler (Döger, 2010).

Aromatik bileşiklerde birden fazla hidroksil taşıyan yapılara polifenol denir. Bitki polifenolleri, antioksidan özelliklerini hidrojen vericisi olmalarından dolayı kazanırlar. Bazı polifenolik bileşikler ise metal şelatlama kapasitesine sahip antioksidanlardır. Bir polifenolün antioksidan olarak iş gördüğünü kanıtlamak için iki parametreye bakılır. Birincisi, serbest radikal merkezli oksidasyonları erteleme, önleme özelliklerinin var olmasıdır ki bu da okside yeteneğindeki substratlardan daha düşük derişimde var olmak ile mümkündür. İkincisi, süpürme sonucu oluşan radikal oksidasyon zincir tepkimesine kararlı biçimde ket vurmalıdır (Ruskovska ve diğerleri, 2020). Polifenolikler, bitkinin güneş ışığı gören tüm yapılarında oluşabilen organik bileşiklerdir. Organik yapıda olduklarından organik çözücülerde daha iyi çözünmelerine rağmen bir dereceye kadar suda da çözünebilirler. Flavonoidler ise bitkileri mikroorganizmalar, UV vb. çevresel tehditlerden korurlar. Bitkilerin, yüksek UV indeksine rağmen gelişimlerine devam edebilmeleri flavonoid sentezinin üst düzeyde olması ile açıklanmaktadır. İnsanlarda flavonoidler, kalp damar sistemi ve immün sistem için elzemdir (Silinsin, 2016).

Hücreye dış ortamdan aktarılan antioksidanların serbest radikal hasarını önlemede büyük rol oynadığı saptanmıştır. Yapılan araştırmaların sentetik antioksidanların canlı için toksik etkilerde bulunduğunu ortaya çıkarması doğal antioksidanlara ilgiyi artırmıştır (Döger, 2010). Tüm bu sebepler endemik bitkilerin var oldukları coğrafyadaki allelopatik etkiler dahilinde ürettikleri sekonder metabolitlerin biyolojik aktiviteleri hakkında büyük merak ve heyecan uyandırmaktadır. Antioksidan

maddeler yaşlanma karşıtı etkileri ile de kozmetik sektörünün ilgisini çekmektedir. Sentetik ilaçların süreç içerisinde organizmaya verdiği zararlar bitkilerdeki sekonder metabolitlere ilgiyi artırmıştır. Bitkilerde doğal olarak sentezlenen sekonder metabolitlerin antiviral, antioksidan, antibakteriyal, antitümör kapasiteye sahip oldukları yapılan araştırmalar sonucu keşfedilmiştir. Tüm bu çalışmalarda amaç, sentetikten doğal ürünlere yönelmek ve yan etkiyi en aza indirmektedir (Menekşeoğlu, 2021).

Endemik bitki türlerinin araştırılmamış farklı biyolojik aktiviteleri göz önüne alınarak, mevcut tez çalışmasında, Türkiye'deki endemik bitki türlerinden olan *Astragalus tokatensis* Fisch., *Helichrysum noeanum* Boiss. ve *Stachys huber-morathii* R. Bhattacharjee'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antioksidan ve sitotoksik aktivite potansiyelleri değerlendirilmiştir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1 Kuramsal Temeller

#### 2.1.1 Serbest radikaller

Serbest radikaller, en dıştaki orbitalinde ortaklaşmamış elektron barındıran iyon ya da nötr olabilen atom veya moleküllerdir. Oldukça reaktif olan bu moleküller organizmanın biyokimyasal reaksiyonları sırasında oluşabileceği gibi dış etkenler sayesinde de oluşabilir. Oksidatif fosforilasyon ile enerji sağlayan canlılarda oksijen radikallerinin oluşumu kaçınılmazdır. Redoks tepkimeleri sonucu oluşan radikaller biyolojik defekt olarak görülmemelidir. Organizmada oluşagelen radikallerin bertaraf edilmesi orantılı ise bu bileşiklerin zararlı etkileri oluşmadan önlenmiş olacaktır. Radikal oluşumu yıkımından hızlı gerçekleşecek olursa zararlı etkiler de ortaya çıkmaya başlar (Tuzcu, 2000). Reaktif oksijen türleri, kontrollü koşullar altında ve sınırlı miktarlarda salındıklarında, sinyal ara maddeleri olarak hareket ederek hücrel çöğalmaya, yaşlanmaya ve hayatta kalmaya katkıda bulunur (Serviddio ve diğerleri, 2013). Serbest radikaller, kuvvetli reaktif özellikleri ile hücrel tüm molekül ve makromoleküllere, enzim sistemlerine, biyokimyasal öneme sahip bileşiklere geri dönüşümü mümkün olmayan hasar verebilirler. Hidroksil ve süperoksit radikalleri özellikle membran sistemlerini hasara uğratabilir (Belyurt, 2014). Oldukça kararsız olan bu radikaller başka moleküllerle hızlı ve kolay reaksiyon gösterdikleri için “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen partikülleri (ROP)” adını almaktadırlar (Döner, 2019).

Aerobik organizmalarda yüksek derişimde oksijen varlığı toksik etki yapmaktadır. Oksijen kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu, oksijenin art arda indirgenmesiyle süperoksit ve hidroksi radikali yanı sıra daha kararlı peroksit ve zararsız bileşen su son ürün olarak açığa çıkar. Oluşan kararsız ve reaktif serbest radikaller ise kısa ömürlüdür (Emen, 2006).

Serbest radikaller endojen ve eksojen olarak iki şekilde oluşum göstermektedir. Endojen kaynaklı radikal oluşumu; bazı enzimlerin aktiviteleri sonucu (triptofan dioksijenaz, aminoasit oksidaz vb), elektron transport tepkimelerindeki elektron

kaçakları sonucu (süperoksit oluşumu nedeni), küçük moleküllerin (tiyoller, flavinler, hidrokinonlar vb) redoks tepkimelerinde görev alması sonucu, redoks reaksiyonlarında demir, bakır gibi metallerin görevli olması sonucu, endoplazmik retikulum bağlı sitokromların oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir. Ayrıca; plazma membranındaki enzimlerin aktivasyonu sonucu serbestlenen araşidonik asit oksidasyonu sonucu ve travma, yanık gibi oksidatif stres durumları sonucu da endojen kaynaklı serbest radikaller oluşur. Serbest radikal oluşturan ekzojen kaynaklar; hava kirliliği, solventler, herbisitler, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, radyasyon gibi çevresel faktörlerdir. Hatta çevresel kaynaklı stres katekolaminlerin sentezini uyarır, katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikaller meydana gelmektedir (Döner, 2019).

Birçok hastalığın patogeneğinde serbest radikallerin olduğu saptanmıştır. Yaşlanma ile birlikte gelen sinir sistemi hastalıkları ve kanser reaktif serbest radikallerin yol açtığı hasarlarla ilgilidir (Emen, 2006). Nekrotik veya apoptik hücre ölümleri hariç beslenme şekli ve çevresel faktörlerin etkisi sonucu bazı genlerin mutasyona uğraması ile değişen hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen hastalığa kanser denmektedir (Song ve diğerleri, 2008). Başlangıçta somatik hücrelerde DNA mutasyonu gerçekleştiren serbest radikaller, daha sonra tümörojenik hücrelerin dağılmasına katkıda bulunarak kanser gelişimini hızlandırmış olurlar (Emen, 2006).

Canlılarda reaktif azot ve oksijen çeşitlerinin oluşum ve bertaraf hızı denge içinde olmalıdır. Organizmada reaktiflerin derişimi artmaya başladığı durumda “Oksidatif Stres” oluşmaktadır. Böyle bir durumda metabolizmadaki reaksiyonlar ve organizmadaki makromoleküller olumsuz etkilenir. Antioksidan sistemler tarafından bertaraf edilemeyen radikaller hücrenin doğrudan ya da dolaylı biçimde ölümüne yol açarlar (Döğer, 2010).

### **2.1.2 Antioksidanlar**

Antioksidanlar, organizmada endojen veya ekzojen kaynaklı ortaya çıkan serbest radikallerin zararlı etkilerini bertaraf eden maddelerdir (Kolaç ve diğerleri, 2017). Antioksidanlar bu işlevlerini hidrojen atomu vererek gerçekleştirirler. Böylece serbest radikalleri reaktif olmayan kimyasal forma sokarak okside olmuş antioksidanlar radikallere çevrilirler. Antioksidanlar serbest radikalleri sadece

hidrojen vermek sureti ile değil de radikalleri düşük reaktiviteli forma sokup lipidler ile tepkimeye girmesini engellemektedirler (Belyurt, 2014).

Gıda ve farmasötik ürünlerdeki oksidatif bozulmaya karşı koyması ve vücutta oksidatif stres gibi patolojik süreçlere olumlu etkisinden dolayı antioksidanlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Antioksidanlar, özellikle gıda ürünlerinde lipit perosidasyonunu geciktirmek sureti ile gıda depolamada ürünün lezzetini, rengini, dokusunu korumada ve gıda raf ömrünü uzatmada işlevseldir. Son yıllarda güvenli ve doğal antioksidan kaynaklarına olan ilgi artmaktadır. Özellikle bitkisel kaynaklı doğal antioksidanların araştırılmasına önem verilmektedir. Bununla birlikte işlevsel antioksidanlar, ucuz, etkili, düşük konsantrasyonda dahi son derece kararlı, toksik olmayan, ürünlere kolayca entegre edilebilen iyi çözünürlüğe sahip olması gerekmektedir (İlhami, 2020).

Serbest radikallerin organizmadaki zararlarını bertaraf etmek için görevli savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri denir. Bu sistemler farklı etki mekanizmaları ile savunma işlemini gerçekleştirir (Belyurt, 2014). Antioksidanların etki mekanizması aşağıdaki şekilde açıklanabilir:

**Bastırıcı etki:** Bu etkiye sahip antioksidan madde reaktif oksijen radikalleri ile etkileşip radikallere hidrojen aktarımı yapmak sureti ile inaktif forma dönüştürme yeteneğindedir. Flavonoidler ve vitaminler bu şekilde etki mekanizmasına sahiptir.

**Toplayıcı etki:** Bu etkiye sahip antioksidan madde reaktif serbest oksijen radikallerini tutma veya daha az reaktivite yeteneğine sahip bir moleküle dönüştürme yeteneğindedir. Trakeobronşial mukus, antioksidan enzimler bu tarz etki mekanizmasına sahiptir.

**Zincir kırıcı etki:** Bu etkiye sahip antioksidan madde reaktif radikallere tutunarak reaksiyon zincirlerini bozar. Hemoglobin, bilirubin ve mineraller bu tarz etki mekanizmasına sahiptir.

**Onarıcı etki:** Bu etkiye sahip antioksidanlar reaktif radikallerin oluşturduğu tahribatı onarıcı etki gösterir.

**Tamamlayıcı etki:** Bu etkiye sahip antioksidan madde Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler ve nonenzimatik antioksidanların sentezini artırıcı sinerji ile etki gösterir (Zanbak, 2019).

En etkili antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonuna müdahale etme yeteneğine sahip olanlardır. Bu antioksidanların oksidasyon sırasında oluşan serbest radikallere hidrojen vermesine izin veren fenolik veya aromatik halkalar içerirler. Radikal ara ürün daha sonra aromatik halka içindeki elektronun rezonans delokalizasyonu ile stabilize edilir (Tan ve diğerleri, 2018).

Antioksidan maddelerin doğadaki en önemli kaynağı bitkilerdir. Diğer tüm organizmalar gibi bitkiler de ekosistemde türünü devam ettirebilmek, büyümek, gelişmek ve korunmak amacı ile farklı sekonder metabolitler salgırlar. Sekonder metabolitlerin bilinen en önemlileri; fenolikler, terpenler, alkaloidlerdir. Örneklendirecek olursak antikanser özelliğinde ki toksol bir terpendir. Alkaloidler ise hücre membranından hızlıca geçebilme özelliğinden dolayı farmakolojik öneme sahiptir. Sekonder metabolitlerin etki mekanizmalarının anlaşılması ve önemli antioksidan kapasitelerinden dolayı tıbbi öneme sahiplerdir (Emen, 2006).

İlerleyen bilimsel yöntemler ışığında sentetik olarak oluşturulan antioksidanlar da özellikle gıda maddelerine eklenerek kullanılmaktadır (M. Işık, 2012). Son yıllarda sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilir alternatif bitkisel kaynaklı antioksidanların araştırılması hız kazanmıştır. Bazı çalışmalarda sentetik antioksidanların karsinogen etki yaptığı anlaşıldığından kullanım alanları daraltılmıştır (Kaya, 2016).

### **2.1.2.1 Enzimatik antioksidanlar**

Süperoksit dismutaz (SOD): Anyon halinde reaktif olan süperoksit radikallerini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren metalloenzimlerdir. SOD, aerobik yaşama adapte olmuş tüm canlılarda ve hücrelerde bulunmaktadır.

Katalaz (KAT): Hücre içinde peroksizomlarda bulunan katalaz, hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve su son ürününe dönüştürür.

Mitokondrial sitokrom oksidaz: Aerobik solunum zincirinin elektron taşınım sisteminde en son enzim olarak görev yapan ve süperoksit radikalini suya çeviren enzimdir (Silinsin, 2016).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) redüktaz ve transferaz: Aktivitesi için indirgenmiş glutatyona ihtiyaç duyan enzim, hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin detoksifikasyonunda işlevseldir.

Ksantin oksidaz: Moleküler oksijenden çok NAD<sup>+</sup> kullanan enzim, hasar almamış dokularda bir dehidrojenaz olarak çalışır. Pürin katabolizmasında hipoksantinden, ksantin ve ksantinden ise ürik asit meydana gelmesi aşamalarında rol oynar. Fazlaca fiziksel aktivitenin ürik asit derişimini artırdığı bilinmektedir. Ürik asit derişimi arttıkça kaslara difüze olur ve kasları oksidasyon tehlikesinden korumuş olur (M. S. Koçak, 2015).

### **2.1.2.2 Nonenzimatik antioksidanlar**

Glutasyon; peroksit ve serbest radikaller ile tepkimeye girerek oksidatif hasarı bertaraf eden güçlü bir antioksidandır. Hücre içindeki aminoasit taşınımı sağlayan ve çeşitli metabolitleri detoksifiye eden glutasyon aynı zamanda oksidatif stres durumunda eritrositleri, lökositleri ve göz lensini stabil tutmakta oldukça önemlidir (Belyurt, 2014).

E vitamini; yağda çözünebilme özelliğindeki E vitamini benzerleri içinde en güçlü antioksidandır. Zincir kırıcı etkisi ile lipid peroksidasyonunu engeller. C vitamini; ekstraselüler sıvının elzem antioksidanı olmasının sebebi suda çözünebilme özelliğidir. Polar ortamda hidroksit, süperoksit gibi radikalleri zararsızlaştırdığı gibi E vitamini ve glutasyonun da yenilenmesini sağlar (M. S. Koçak, 2015).

A vitamini; yağda çözünebilen vitamindir.  $\beta$ -karoten halinde metabolizmada reaktif singlet oksijen radikali tutucusudur. Peroksil, hidroksil, alkoksil gibi serbest radikaller ile etkileşip lipid peroksidasyonuna ket vurur. Melatonin; üreme, uyku gibi biyolojik işlevleri regüle eden melatonin hormonu oldukça güçlü bir antioksidandır. Reaktif hidroksil radikalini detoksifiye etmektedir. Yağ ve suda iyi çözünen melatonin lipofilik doğası dolayısı ile hücre içi ve hücreler arası her yapıya kolaylıkla girerek daha geniş bir sahada aktivite gösterir (Bingöl, 2016).

### **2.1.3 Fenolik bileşikler**

Birçok bitkide doğal olarak bulunan fenolik bileşikler, fitokimyasalların büyük bir bölümünü oluşturan esansiyel bileşiklerdir. Aromatik yapılarında birden çok hidroksil taşıyan bileşiklere polifenol denmektedir. Antioksidan özellik taşıyan polifenoller; oksidasyon ya da serbest radikal kaynaklı oksidasyonu geciktirme, önleme, erteleme özelliklerini barındırması gerekmektedir (Silinsin, 2016). Öncül fenol, güneş ışığı ile bitkilerin dal, yaprak, çiçek ve meyvelerinde polifenolik

bileşiklere dönüşür. Organik çözücülerde yüksek oranda çözünebilen bu bileşikler suda da orta derecede çözünebilmektedirler (Bingöl, 2016). Bazı kaynaklarda, fenolik bileşikler permabilite artırıcı faktör olarak geçmektedir. Yani fenolik fitokimyasalların damar geçirgenliğini artırdığı saptanmıştır (Ayhancı, 2019).

Fenolik asitler ise organik yapılarındaki aromatik halkaya bağ yapmış bulunan hidroksil gruplarının yer ve sayısına göre antioksidan aktivite ve kararlılık olarak farklılık göstermektedir. Fenolik asitlerde metal şelatlama, süperoksit anyonlarını bertaraf etme, hidroksi ve peroksil anyonlarını bertaraf etme gibi antioksidan özellikler kaydedilmiştir (Kaya, 2016). Fenolik (karbohidrat türevleri) antioksidanların en yaygın olanları; sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Emen, 2006).

#### **2.1.4 Flavonoidler**

Flavonoidler, bitkilerde sıklıkla bulunan, renkleri dolayısıyla latince ‘sarı’ anlamı taşıyan ‘flavus’ sözcüğünden adını alan polifenol bileşiklerdir. Bitki pigmenti olarak da iş gören flavonoidler, meyvelerde, sebzelerde, ağaç kabuğunda, köklerde, gövdelerde, çiçeklerde, çayda ve kırmızı şarapta bulunmaktadır (Akpınar, 2022). Flavonoidler propan zinciri ile iki fenil halkasının organik bağ yapmasından oluşan fenolik bileşiklerdir (M. Işık, 2012). Flavonoidler, benzo- $\gamma$ -piron yapısında olduğundan bitkilerdeki mikrobiyal enfeksiyonlara yanıt olarak üretilen hidroksillenmiş fenolik bileşiklerdendir. Flavonoidlerin kimyasal yapısında bulunan fonksiyonel hidroksiller reaktif radikalleri temizleyerek veya metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan savunmaya katkıda bulunur (Yıldız, 2020).

Flavonoidler antioksidan özelliklerinin yanı sıra antienflamatuar, antiviral, antimutajenik, antikanserojen, antiproliferatif özelliklerine de sahip olduğundan çeşitli farmasötik tıbbi ve kozmetik alanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Akpınar, 2022).

İnsan sağlığı için hayati öneme sahip olan antioksidan savunma mekanizmalarına katkıda bulunan flavonoidler besin olarak tüketilen taze, kuru meyve veya sebzelerden alınmaktadır. Flavonoidlerin çok etkili antioksidan olmasının sebeplerinden biri de düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıkları engelleme potansiyelidir (İlhami, 2020).

### 2.1.5 Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Antioksidan kapasitesinin tanımı yapılırken farklı bilimsel çalışmalarda; güç, parametre, potansiyel, etkinlik, aktivite gibi terimler kullanıldığı görülür. Kimyasal aktivite, farklı deney koşullarında basınç, reaksiyon ortamı, sıcaklık, pH gibi parametrelere bağlı sonuç verir. Böylece antioksidan kapasite veya antioksidan aktivite de o koşullara göre alınan ölçümleri verecektir (Belyurt, 2014).

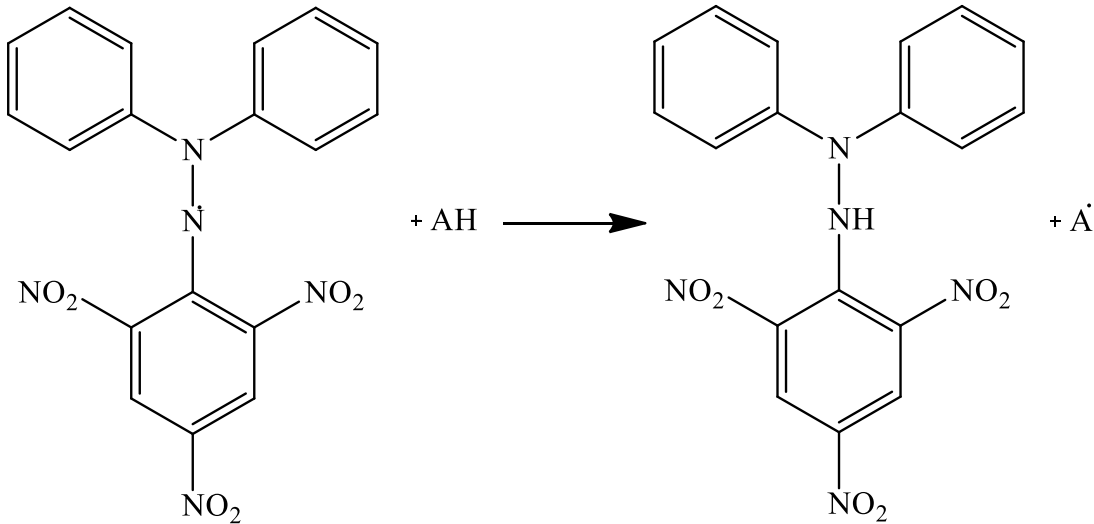
Antioksidanlar, oksidasyon süreçlerini engelleyerek fonksiyonel gıda bileşimlerini koruması yönüyle de önemli işleve sahiptirler. Antioksidan aktivite, diğerleri arasında hidrojen atomu transferi, tek elektron transferi, indirgeme gücü ve metal şelasyonu dahil olmak üzere farklı mekanizmalara sahip çeşitli tahlillerle izlenebilir. Araştırmak istediğimiz içerikte antioksidan potansiyelinin geçerli bir şekilde değerlendirilmesi için doğru yöntem seçimi, reaksiyonların temel mekanizmalarını, avantajlarını ve sınırlamalarını anlamak önemlidir (Shahidi ve Zhong, 2015). Doğru yöntem belirlenmesi literatürde bulunan deneysel koşulların değişkenliğini göz önünde bulundurarak başka araştırmacıların sonuçlarıyla karşılaştırma yapabilmeye olanak sağlayacak potansiyeline göre yapılmalıdır. Farklı türler için farklı yöntemlerin sonuçları, bitki özlerinin antioksidan aktivite seviyelerine göre sıralanmasına izin veren en iyi yöntemi belirlemek için değişkenli istatistiksel tekniklerin tanımlayıcı prosedürleri kullanılarak analiz edilmelidir (Chaves ve diğerleri, 2020).

Hücre stoplazmasında varolan tüm antioksidanlar etkileşim durumundadır. Bu etkileşim ile sinerji oluşturup daha yüksek bir antioksidan aktivitesi gösterirler. Yani antioksidanların tek tek ölçümünün alınması yerine toplam antioksidan kapasitenin (TAK) ölçülmesi daha verimli olmaktadır. Çünkü bu yaklaşımda enzimatik ve nonenzimatik tüm antioksidan maddelerin toplam aktivitesi ölçüldüğü için daha doğru bir yaklaşım sağlar. Total antioksidan kapasite farklı ve fazla sayıda yöntemlerle saptanabilir. Bu yöntemlerdeki prensipler; hidrojen atomunun aktarımı üzerinden ve elektron aktarımı üzerinden yapılan ölçümlerle total antioksidan kapasitesini belirlemek süreçlerini içerir (Döner, 2019). Hidrojene dayalı yöntemleri; demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP) ve bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemidir (CUPRAC). Oksijen transferine dayalı yöntemleri; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC), Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC),

$\beta$ -karoten, Folin metodudur. Bu metodlardan herhangi birini kullanarak antioksidan kapasitenin saptanması için bütillendirilmiş hidroksi toluen (BHT), gallik asit, kateşin, Trolox gibi standart bir antioksidan eşdeğeri türünden en az üç farklı derişim ile çalışılmaktadır (Tanrıöver, 2019).

### 2.1.5.1 DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi

1995 yılında Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen DPPH yöntemi, 1998 yılında Sanchez ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir (Akpınar, 2022). Kullanılan içerikte antioksidan kapasitenin ölçülmesi için sentetik ve kararlı bir radikal olan DPPH kullanılmaktadır. Koyu mor renkte olan DPPH, antioksidandan bir proton alarak renksiz  $\alpha$ ,  $\alpha$ - difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil'e dönüşmektedir. Yani ortamda antioksidan madde varsa DPPH'nin rengi açılır ve indirgenir (Şekil 2.1). Antioksidan derişimi arttıkça renk daha da açılmaktadır (Belyurt, 2014). DPPH'nin kararlı olarak karakterize edilmesinin sebebi dimerize olmamasıdır. Yani yapısal delokalize elektron varlığı dimerizasyona engel olmaktadır. DPPH radikal süpürme yöntemi, antioksidan aktiviteyi ölçmek ve özellikle nonenzimatik antioksidanların radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan kolay, ekonomik, hızlı, verimli bir yöntemdir (İlhami, 2020).



Şekil 2.1: Kararlı radikal DPPH indirgenmesi.

Spektrofotometrik tekniğe dayanan DPPH absorbans değeri olarak maksimum piki 517 nm'de vermektedir. Bu testin önemli bir sınırlaması DPPH ile aynı dalga boyu aralığında absorbans değeri veren bileşiklerin örtüşen spektrumlarıdır. Örneğin antosiyaninler DPPH ile aynı dalga boyu aralığında güçlü absopsiyona sahiptir ki bu

nedenle antioksidan kapasite belirlemesi yapılırken diğer metodlara da yer verilmelidir (Shahidi ve Zhong, 2015).

### **2.1.5.2 Metal şelatlama aktivitesi**

Organizma için gerekli elementlerden biri olan demir (Fe), aynı anda protein, lipid ve diğer makromoleküller, bileşenler için istenmeyen oksidatif tepkimelere yol açabilmektedir. Demir, fenton reaksiyonları sonucu reaktif serbest radikal oluşturabilme özelliğindedir. Bu nedenle bu reaksiyonlardaki Fe<sup>+2</sup> derişiminin azalması ile oksidatif hasar bertaraf edilir. Fenton reaksiyonu: Fe<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>+3</sup> + HO + HO şeklinde gerçekleşir. Antioksidan maddelerde metal şelatlama özelliği de var ise serbest demiri kendisine bağlamak suretiyle fenton reaksiyonlarına ket vurur. Böylece hidroksil ve peroksit gibi reaktif radikallerin oluşumu inhibisyona uğrar (Belyurt, 2014). Decker ve Welch'in geliştirdiği metal şelatlama tekniğinde şelatlayıcılar, metal iyonlarıyla δ bağı yaparak metal iyonlarının redoks potansiyelini azaltıp etkili antioksidanlar olarak davranırlar (Kaya, 2016).

Demir sülfat ve ferrozin, en yaygın olarak kullanılan demir iyon kaynaklarıdır. Antioksidanların bu kaynaklara eklenmesinden sonra 485 nm'de (demir sülfat için) veya 562 nm'de (ferrozin için) absorbans kaybı, metal-antioksidan kompleksinin oluşumunu temsil eder ve eklenen antioksidanın metal şelasyon kapasitesi spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Birçok durumda, antioksidanların metal şelatlama kapasitesi etilendiamintetraasetik asit (EDTA) eşdeğerleri olarak ifade edilir. EDTA, birçok gıda ve farmasötik uygulamada kullanılan standart bir metal şelatördür (İlhami, 2020). Biyolojik sistemlerde bulunan albümin, transferin, ürik asit, seruloplazminler, melatoninler gibi bileşenlerin metal şelatörü oldukları saptanmıştır (Emen, 2006).

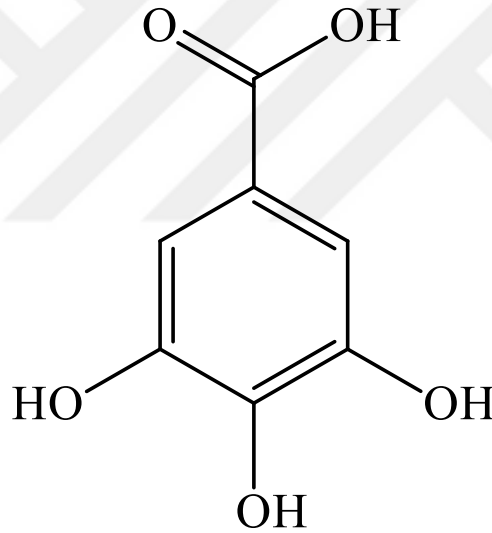
Bitkilerde doğal olarak bulunan antioksidan flavonoidler, hidroksil grubu ile karbonil grubunun düzenlenmesine ve elektron veren veya çeken süstitüentlerin varlığına, kararlı fenoksil radikalının oluşumu için elektronu delokalize etme yeteneğine bağlı olan metal şelatlama potansiyeline sahiptir (Shivakumar ve Yogendra Kumar, 2018).

### **2.1.5.3 Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi**

Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi hususunda birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerde bitki ve gıda maddelerinin toplam fenolik içeriği gallik asit (Şekil 2.2)

veya başka bir varsayılan fenolik bileşik eşdeğeri ile mukayese edilerek sonuca varılmaktadır. Yüksek miktarda fenolik içerik, yüksek antioksidan yeteneği ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, toplam fenolik içerik toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için önemli bir parametredir (İlhami, 2020).

Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi antioksidan madde tayini çalışmalarında tamamlayıcı bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bunun sebebi fenolik bileşiklerin yapısı antioksidanların doğal kaynağı oluşudur (Menekşeoğlu, 2021). Toplam fenolik içeriğin belirlenmesinde popüler olarak kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi, 1965 yılında Singleton ve Rossi tarafından geliştirilmiş, günümüzde bazı modifikasyonlar ile kullanımına devam edilmiştir (Tanrıöver, 2019). Yöntemin temel prensibi, fenolik bileşenlerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleksler oluşturması ile birlikte renk yoğunluğuna göre değişen absorbansın standart gallik asit ile mukayese edilmesidir (Ayhancı, 2019).



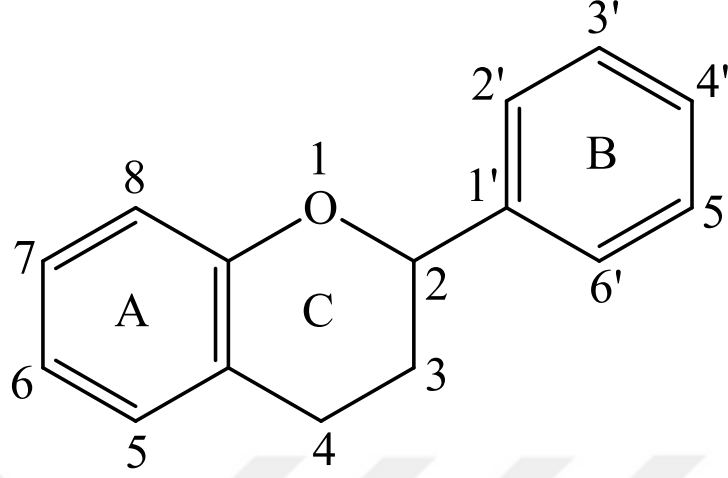
**Şekil 2.2:** Antioksidan ve fenolik bileşik olan standart gallik asit açık formülü.

FC, 1927 yılında Folin ve Ciocalteu tarafından, proteinlerde fenolik amino asit olan tirozin içeren proteinleri analiz için tasarlanmıştır. Daha sonra modifiye edilerek gıda ve bitki ekstraktlarındaki fenolik içeriğin analizi için benimsenmiştir (İlhami, 2020).

#### **2.1.5.4 Toplam flavonoid içeriğin belirlenmesi**

Bitkilerde doğal olarak varolan bizim de gıda olarak aldığımız polifenolik grup içerisinde yer alan flavonoidlerin (Şekil 2.3) saptanmasında çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Potasyum asetat /AlCl<sub>3</sub> spektrofotometrik metodunda alüminyum klorür,

flavonol veya flavon'un C-4 keto grubu ve C-3 yada C-5 hidroksil gruplarından herhangi biri ile kararlı bir şelat oluşturmaktadır (Bener, 2009).



**Şekil 2.3:** Flavonoid halkası.

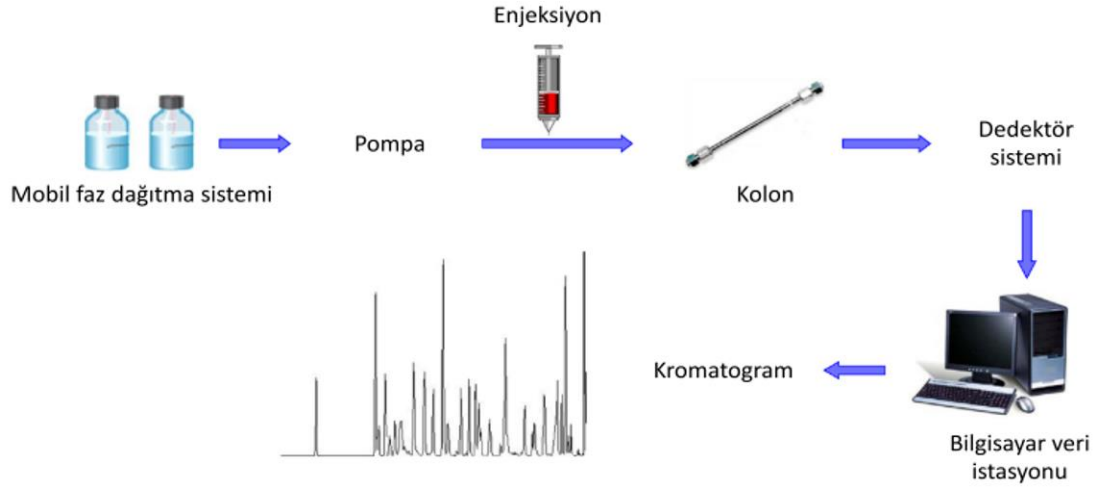
Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC) genel prensibi ise, ortamda indirgen varlığında  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının  $\text{Cu}^{+1}$  iyonlarına indirgenmesi ile oluşan  $\text{Cu}^{+1}$  iyonlarının neokuproin ile reaksiyonu sonucu oluşan kompleksin 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile alınan absorbans değerlerinin değerlendirilmesi esasına dayanır. Burada yüksek absorbans değeri alınması ortamda yoğun antioksidan flavonoid varlığını işaret etmektedir. Bu yöntemde de troloks gibi bir standart ile karşılaştırma yapılarak yorumlar yapılır (M. S. Koçak, 2015).

#### **2.1.5.5 HPLC analizi ile antioksidan etkinin ölçülmesi**

Kromatografi, birbirine karışmayan bileşenlerin olduğu karışımlardaki bu bileşenleri sabit faz ile mobil faz arasında dağıtarak ayırmayı hedefleyen tekniktir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ise, karışım içindeki bileşenlerin saflaştırılması esasına dayanır. HPLC, çok kısa sürede birçok molekülün yapısal ve işlevsel analizini yapmasının yanı sıra saflaştırma yapan bir teknik olduğu için oldukça popülerdir (Akpınar, 2022).

HPLC yönteminde sabit faz olarak mikropartiküllü maddeler tercih edilmektedir. Buradaki amaç, hareketli fazın akışına direnç sağlamak ve böylece hareketli faz pompalanması yüksek basınç altında gerçekleştirilebilmektedir. HPLC yönteminde saflaştırılacak karışım sisteme bir enjektör aracılığı ile aktarılır ve hareketli faz denen

çözücü akışı ile basıçlı bir şekilde kolondan geçirilir. Kolonun için mikropartüküller içeren sabit faza sahiptir. Hareketli faz kolondan sabit faz üzereinden akarken numunedeki bileşenler sabit veya hareketli faza olan afiniteleri sebebi ile bantlar oluşturur. Sabit faz boyunca bu bantlar devam eder ve bu işlem elüsyon adını alır. İlerleyen bantlar detektörden geçerken bir kaydedici ile kolondan çıkan her bir bileşen pikler halinde grafiğe dökülür (Şekil 2.4). Böylelikle yöntem amacı olan ayırma işlemini tamamlamış olur (Susuz, 2010).



Şekil 2.4: HPLC analiz sistemi (Akpınar, 2022).

Kromatografide kullanılan bazı kavramlar şunlardır;

Alıkonma zamanı, bir karışım kolondan sabit fazla etkileşimdeyken geçirdiği süreyi ifade eder. Kapasite faktörü (alıkonma faktörü,  $k$ ), karışımda kolonda hiç tutulmayan bileşenlerin alıkonma zamanı olarak tanımlanır. Teorik tabaka sayısı ( $N$ ), kolon boyunun teorik tabaka yüksekliğine oranı şeklinde hesaplanır. Seçicilik ( $\alpha$ ), beraber seyreden komşu piklerin bağıl alıkonmasıdır. Ayırma gücü ( $R_s$ ), birlikte seyreden komşu piklerin birbirinden ayrılması olarak ifade edilir (Akpınar, 2022).

## 2.2 Kaynak Araştırması

Nayeem ve diğerleri (2022), *Astragalus spinosus* (Forssk.) Muschl'dan elde ettikleri ekstraktlardan analjezik ve anflamatuar aktivite tayini planlamışlardır. Bitki gövdelerinden elde ettikleri tozu, çözücü olarak kloroform ve metanol kullanılarak ekstraksiyonu tamamlamışlardır. Toplam fenolik bileşiklerin tayini için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanmışlardır. Toplam flavonoid bileşiklerin tayini için alüminyum klorür prosedürü uygulanmıştır. 250 ve 500 mg/kg'da kloroform ve

metanolik ekstraktları analjezik aktivite için teste tabi tutmuşlardır. Bu sonuçlara göre antiinflamatuvar özellik için sadece metanolik ekstraktlar seçilmiştir. Analjezik etki, sıcak plaka modeli ile erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Anti-inflamatuvar etki, karagenan sıçan pençe ödem modelinde incelenmiştir. Metanol ekstaktının toplam fenoliklerini 420 mg, kloroform ekstraktının toplam fenoliklerini 265 mg olarak ölçmüşlerdir. Toplam flavonoid içeriği ise metanol ekstraktı için 68 mg, kloroform ekstraktı için 17,5 mg olarak ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda metanolik ekstraktların kloroform ekstraktlarına göre daha fazla analjezik ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiği, bu duruma sebep ise fenolik ve flavonoidlerin bu metanolik ekstraktta daha yoğun saptanması olduğu ifade etmişlerdir.

Rosa ve diğerleri (2007), *Helichrysum italicum*'dan elde ettikleri çeşitli fenolikler ve terpenoidlerin nonenzimatik lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 37°C'de *Helichrysum*'dan elde edilen çeşitli fenolikler ve (mero)terpenoidlerin otooksidasyon ve EDTA aracılı oksidasyon deneylerinde linoleik asidi serbest radikal saldırılarına karşı koruyabildiğini saptamışlardır. Araştırmacıların bitkiden elde ettikleri helipiron ve arzanolün yüksek seviyede antioksidan aktivite gösterdiği kolesterolün termal (140°C) otooksidasyon analizlerinde test etmişlerdir. Ayrıca maymun böbreğinden türetilen bir fibroblast dizisi olan VERO hücrelerinde arzanolün sağlıklı hücreler için sitotoksik olmayan derişimlerinde, VERO hücrelerinde oksidatif stresi güçlü şekilde inhibe ettiğini saptamışlardır. Mevcut çalışmaların sonucunda bileşik arzanolün farklı *in vitro* koşullarda lipid peroksidasyonuna ket vuran antioksidan özellikleri ortaya çıkarılmıştır.

Zengin ve diğerleri (2020), *Helichrysum stoechas*'ın kök üstü yapılarından elde ettikleri materyal ile farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak (hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE), mikrodalga yardımcı ekstraksiyon (MAE), ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon (UAE), Soxhlet ekstraksiyonu (SE), maserasyon) oluşturulan ekstraktlardan antioksidan ve enzim inhibitörü aktivitelerini çalışmışlardır. Farklı yöntemlerle elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri miktar olarak ASE > MAE > UAE > maserasyon > SE sırasında olduğunu saptamışlardır. ASE yöntemiyle elde ettikleri ekstraktların DPPH ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'e karşı 219,92 ve 313,12 mg Trolox eşdeğeri/g oranında en güçlü radikal süpürücü özellikte olduğunu açıklamışlardır.

Aynı zamanda ASE yöntemiyle elde ettikleri ekstraksiyonun CUPRAC ve FRAP teknikleriyle metal şelatörü olduğunu da gözlemlemişlerdir. UAE tekniği ile elde ettikleri *Helichrysum stoechas* özütü en aktif metal şelatörü (18,67 mg etilen diamin tetraasetik asit eşdeğer (EDTA)/g), asetilkolinesteraz inhibitörü (4,23 mg galantamin eşdeğeri (GALAE)/g) ve butirilkolinesteraz- kolin esteraz inhibitörü (6,05 mg GALAE/g) olarak gözlemlemişlerdir. Maserasyon ekstraktları tirozinaz inhibisyonu sağlarken ASE ekstraktlarının  $\alpha$ -glukosidazı etkili bir şekilde inhibe ettiğini izlemişlerdir. Çalışmanın sonucu olarak *Helichrysum stoechas*'ın kök üstü kısımlarında biyoaktif sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu için farklı yaklaşımlar olan ASE ve UAE'nin kullanılmasının daha uygun olduğunu açıklamışlardır.

Sen ve diğerleri (2019), *Stachys subnuda* Montbret & Aucher ex Benth (*S. subnuda*)'nın kök üstü kısımlarından uçucu yağ, gaz kromatografisi (GC) ve GC7/kütle spektrometrisi (MS) teknikleri ile antiinflamatuvar aktivite ve antioksidan aktiviteyi değerlendirmişlerdir. Anti-inflamatuvar aktivite değerlendirmesi lipoksijenaz inhibisyon deneyi ile gözlemlenmiştir. Antioksidan aktivite DPPH ve ABTS yöntemleri ile belirlenmiştir. Toplam uçucu yağ tüm bileşimin %97,1'ini oluşturan altmış iki bileşen tanımlanmıştır. Fitol (%25,2),  $\beta$ -karyofillen (%11,2), germacrene D (%6,9) ve heksadekanoik asit (%6,9), *S. subnuda*'nın kök üstü kısımlarının uçucu yağlarından olduklarını saptamışlardır. Total uçucu yağ bileşiminin ABTS ve DPPH radikalleri için sırasıyla 0,124 mg/mL ve ve 0,204 mg/mL'lik medyan inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) ile önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Total uçucu yağın, 0,419 mg/mL'lik bir IC<sub>50</sub> değeri ile orta düzeyde antiinflamatuvar aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. Çalışmaların sonucunda *S. subnuda*'nın esansiyel yağlarının iyi bir anti-inflamatuvar aktivite ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu anlaşılmıştır.

Goldansaz ve diğerleri (2017), yaptıkları bu araştırmada *Helichrysum leucocephalum*'ın etanolik ekstraktının toplam fenolik içeriği, antibakteriyel ve antioksidan etkisini değerlendirmişlerdir. Sentetik antioksidan ve antibiyotiklerin istenmeyen yan etkileri sebebi ile fitomedikallerin kullanımına ilgi artmıştır. Bu çalışmada, *H. leucocephalum*'un etanolik özütünden elde ettikleri toplam fenollerinin antioksidan kapasitesi DPPH tahlili ile araştırmışlardır. Serbest radikal temizleme kapasitesini için IC<sub>50</sub> değeri 69,94±0,17  $\mu$ g/mL olarak saptamışlardır. Antibakteriyel aktivite için Disk difüzyon yönteminden yararlanmışlardır. Antibakteriyel aktivitenin

değerlendirmesini 125 ila 250 mg/mL arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ile test edilen tüm Gram pozitif bakterilere karşı orta düzeyde aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Bashi ve diğerleri (2013), yirmi farklı *Stachys* türünden hidrodistilasyon yöntemiyle izole ettikleri uçucu yağları gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile analiz etmişlerdir. Total uçucu yağ bileşiminden %70,5-97,8'ini oluşturan otuz dokuz bileşik tanımlamışlardır. Uçucu yağların ana bileşenleri olarak germacrene-D (%2,9–45,3), b-karyofillen (%2,3–62,3), karyofillen oksit (iz %7,8), spatulenol (iz %7,8) ve a-kadinen (%1,4-8,5)'i saptamışlardır. Uçucu yağların antimikrobiyal olarak değerlendirme yöntemi disk difüzyon ile *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*'a etkisini ölçmüşlerdir. Çalışma sonucu izole edilen total uçucu yağ bileşeninin, incelenen mikroorganizmalara karşı orta seviyede aktivite gösterdiğini açıklamışlardır.

Bellebcir ve diğerleri (2022), *Astragalus gombo*'nun kök üstü kısımlarını %80 metanol ve %100 saf su ile özütlemişlerdir. İlk özütü, etil asetat, n-bütanol (NBAg) ve metanol ile fraksiyonlamışlardır. Etil asetat (EAAg) fraksiyonundaki fenolik asitlerin oransal olarak en fazlasını, trans-ferulik asit, p-kumarik'in (sırasıyla 1315 ug/g ve 370 ug/g özüt) oluşturduğunu ayrıca yüksek miktarlarda flavonoid içerdiğini (sırasıyla 1155 ve 491 µg/g özü ile cirsiliol ve quercetin-3-O-galaktozid) gözlemlemişlerdir. EAAg fraksiyonunun test edilen tüm yöntemlerde en etkili antioksidan aktivite sergilediğini ve bunu NBAg fraksiyonunun izlediğini açıklamışlardır. Fenolik içerik ve antioksidan kapasiteler arasında önemli doğrusal korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca EAAg fraksiyonun HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksitesite analizi (48 saatlik inkübasyondan sonra) ile sırasıyla 108,8±1,8 µg/mL ve 168,4±1,6 µg/mL IC<sub>50</sub> değerlerini ortaya çıkarmışlardır. EAAg fraksiyonlarının sağlıklı fare karaciğer hücreleri (Am112)'ne karşı önemli seçicilik indeksi sergilediğini de gözlemlemişlerdir. Araştırma sonucunda *A. gombo*'nun EAAg fraksiyonunun; doğal antioksidan ve anti-proliferatif aktiviteye sahip orijinal bir biyoaktif molekül kaynağı olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Acimović ve diğerleri (2021), *Helichrysum italicum*'dan izole ettikleri esansiyel yağın (EO) biyolojik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Sırbistan'da yetişen *H. italicum*'un kimyasal içeriğini gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile analiz etmişlerdir. Ayrıca *H. italicum*'dan izole ettikleri esansiyel yağ ile dört farklı

antioksidan aktivite testi (DPPH ve ABTS testleri, indirgeme gücü ve  $\beta$ -karoten ağartma testi), antimikrobiyal aktivite, *in vitro* antihiperglisemik ve antiinflamatuvar aktivite kapasitelerini değerlendirmişlerdir. Toplam 70 farklı esansiyel yağ bileşeni tespit edilip bunların 17'si (%8,5) tanımlanamamıştır. Uygulanan tüm testlerde *H. italicum*'un gıda, kozmetik ve farmasötik ürünlerde kullanılabilme potansiyeli olan doğal bir antioksidan olduğunu göstermişlerdir.

Jaradat ve diğerleri (2021), çalışmada *Helichrysum sanguineum*'un dört fraksiyonunun; kimyasal bileşimlerini, antioksidan, anti-lipaz ve anti- $\alpha$ -amilaz inhibisyon aktivitelerini tayin etmeyi amaçlamışlardır. *H. sanguineum*, geleneksel tıpta kullanılan çeşitli hastalıklara karşı şifa olduğu düşünülen Filistin topraklarında yetişen bir türdür. Bu çalışmada araştırmacılar *H. sanguineum*'dan elde edilen öz ile aseton, su, metanol ve heksan çözücülerini kullanarak fraksiyonlar elde etmişlerdir. Fraksiyonların antioksidan aktivitelerini kalorimetrik DPPH yöntemi ve pozitif kontrol olarak Trolox kullanarak belirlemişlerdir. Fraksiyonların anti-lipaz aktivitelerini domuz pankreas lipaz enzim inhibitör tahlili ve pozitif kontrol olarak Orlistat kullanarak gözlemlemişlerdir. Fraksiyonların anti- $\alpha$ -amilaz inhibisyon aktivitelerini  $\alpha$ -amilaz domuz pankreas enzimi ve Acarbose ile 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) yönteminin pozitif kontrol olarak kullanmak sureti ile ölçmüşlerdir. Çalışma sonucunda *H. sanguineum*'un heksan fraksiyonunun en yüksek fenol ve flavonoid içeriğine sahip olduğunu ve en iyi antioksidan aktiviteyi ortaya çıkardığını gözlemlemişlerdir. *H. sanguineum*'un sulu fraksiyonu, sırasıyla Acarbose ve Orlistat ile karşılaştırıldığında  $\alpha$ -amilaz ve lipaz domuz pankreas enzimlerine karşı potansiyel inhibisyonlar gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca çalışmada *H. sanguineum*'un sulu fraksiyonunun; diyabetes mellitus, obezite ve oksidatif stres hastalıklarına karşı daha ileri *in vivo* çalışmalar için kullanımını destekleyici açıklamalar yapılmıştır.

Ahmadi ve diğerleri (2022), *Astragalus arbusculus* Bornm'tan yeni karbohidrat içerikler keşfedip bu içeriklerin biyolojik aktivitelerini tayin etmişlerdir. Bu amaç ile *A. arbusculus* saf su ile özütlenip kolon kromatografisi yöntemi (DEAE-52) ile fraksiyonlanmıştır. *A. arbusculus* karbohidrat (AAC) fraksiyonunu, yüksek performanslı sıvı kromatografisi- evaporatif ışık saçılım detektörü (HPLC-ELSD) ile analiz edip kromatogramında iki ana olmak üzere sekiz bileşik saptamışlardır. Bu bileşiklerin izolasyonu için hazırlayıcı-ince tabaka kromatografisi (prep-TLC)'ni kullanmışlardır. Sonuç olarak tüm analizler tamamlandığında içerikte saflaştırılan

sırasıyla 4:1:1 nispi molar orana ve 971,4531 Da moleküler ağırlığa sahip glukoz, ramnoz ve arabinoz dahil altı monosakarit bileşeninden oluştuğunu göstermişlerdir. Ayrıca *A. arbusculus*'dan elde ettikleri bu biyopolimerlerin DPPH'ye karşı değerlendirip antioksidan özellik gösterdiğini saptamışlardır.





### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Kullanılan Bitki Örnekleri

*Astragalus tokatensis* Fisch. (Tokat geveni) türü İran-Turan floristik elementi olup, ülkemiz için endemik bir türdür. Ülkemizdeki yayılış alanları Orta Karadeniz Bölümü ile Orta ve Yukarı Kızılırmak Bölümleri'dir (Davis, 1988; Güner ve diğerleri, 2012; Karaer ve Kılınç, 2001). IUCN kırmızı liste sınıfları ve ölçütleri dikkate alındığında NT (tehlikeye açık) sınıfında yer almaktadır (Tunç, 2019).

*Helichrysum noeanum* Boiss. (Gülazar) türü İran-Turan floristik elementi olup, ülkemiz için endemik bir türdür. Ülkemizdeki yayılış alanları Yukarı Sakarya, Yukarı Kızılırmak, Yukarı Fırat ve Konya Bölümleri'dir (Davis, 1988; Güner ve diğerleri, 2012; Karaer ve Kılınç, 2001). IUCN kırmızı liste sınıfları ve ölçütleri dikkate alındığında LC (düşük riskli) sınıfında yer almaktadır (Tunç, 2019).

*Stachys huber-morathii* R. Bhattacharjee (Kıllı deliçay) türü ülkemiz için yerel endemik bir türdür. Yayılış alanları Orta Karadeniz Bölümü ile Orta Kızılırmak Bölümleri'dir (Davis, 1988; Güner ve diğerleri, 2012; Karaer ve Kılınç, 2001). IUCN kırmızı liste sınıfları ve ölçütleri dikkate alındığında VU (duyarlı) sınıfında yer almaktadır (Tunç, 2019).

Araştırmanın materyali olan bitkiler, 2015-2018 yılları arasında Mart-Ekim döneminde yapılan arazi çalışmalarında çiçeklenme dönemleri dikkate alınarak toplanmıştır. Bitki örneklerinin teşhisleri için Türkiye Florası (Davis, 1988) ve eklerinden (Güner ve diğerleri, 2000), ayrıca güncel kaynaklardan (Güner, 2014; Güner ve diğerleri, 2012) yararlanılmıştır. Toplanan bitki örnekleri herbaryum tekniğine uygun olarak herbaryum örnekleri haline getirilmiştir.

#### 3.2 Bitkilerin Ekstraksiyon Süreci

*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örnekleri ultra-santrifüj öğütücü (Retsch ZM 200, Almanya) ile toz haline getirildikten sonra Soxhlet (Termal, Türkiye) cihazında metanol ve su çözücüsüyle ekstraksiyon işlemine tabi

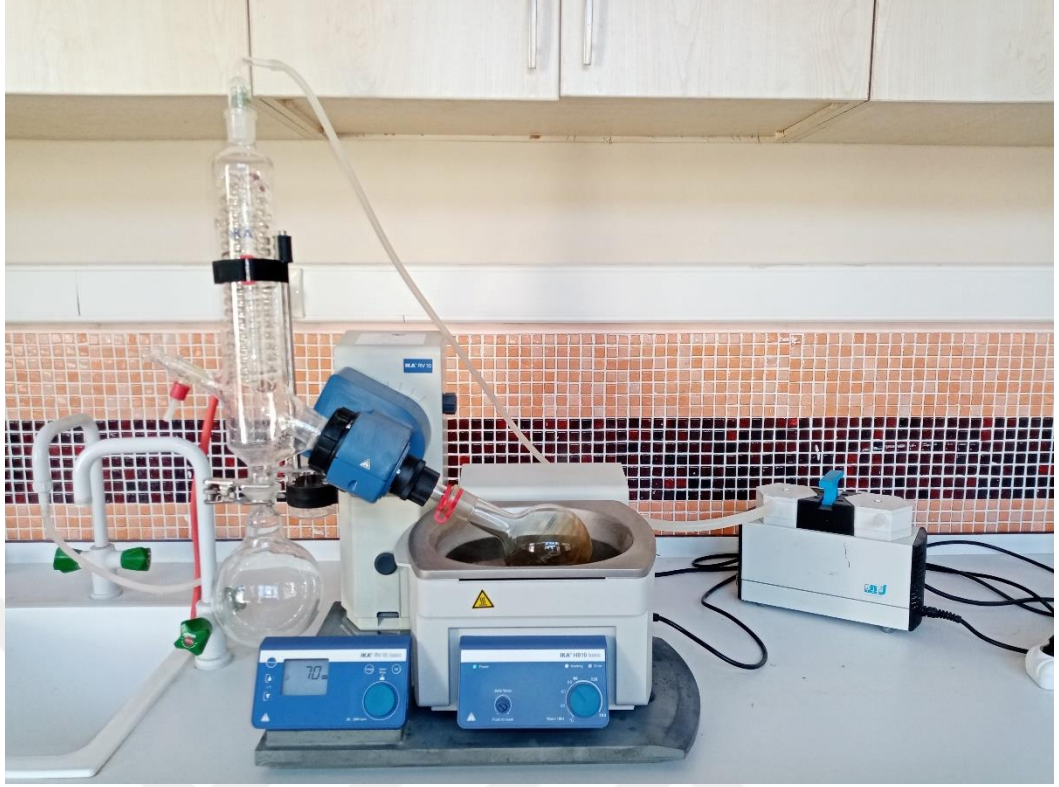
tutulmuştur (Şekil 3.1). Ekstraktlar adi süzgeç kâğıdında süzölmüştür. Elde edilen süzöntöler döner buharlaştırıcı (IKA, Almanya) ile yoğunlaştırılmıştır (Şekil 3.2). Bu sürecin sonunda ham ekstraktlar elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların verim oranları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1:** Bitkilerden elde edilen ekstraktların verim oranları (%).

Ekstrakt	Ekstrakt kısaltması	Verim
<i>Astragalus tokatensis</i> ’ten elde edilen metanol ekstraktı	ATME	8,75
<i>Astragalus tokatensis</i> ’ten elde edilen su ekstraktı	ATSE	9,50
<i>Helichrysum noeanum</i> ’dan elde edilen metanol ekstraktı	HNME	10,10
<i>Helichrysum noeanum</i> ’dan elde edilen su ekstraktı	HNSE	10,80
<i>Stachys huber-morathii</i> ’den elde edilen metanol ekstraktı	SHME	9,00
<i>Stachys huber-morathii</i> ’den elde edilen su ekstraktı	SHSE	14,40



**Şekil 3.1:** Ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği Soxhlet ekstraktörü.



**Şekil 3.2:** Ekstraktların yoğunlaştırılma işleminin gerçekleştirildiği döner buharlaştırıcı.

### **3.3 HPLC Analizi ile Bazı Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması ve Miktar Tayini**

Test edilecek fenolik bileşikler içerisinde gallik asit ve protokateşik asit (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Her bileşiğin 500 mg/L'deki standart stok çözeltileri metanol içinde hazırlanmış ve karanlıkta 4°C'de saklanmıştır. Stok çözeltilerin seri dilüsyonu, günlük standart çalışma çözeltileri elde etmek için metanol/su çözeltisi (v:v, 1:1) ile gerçekleştirilmiştir.

HPLC sistemi (Agilent Technologies 1260 Infinity), kolon fırını (G1316A), otomatik örnekleyici (G1329B), pompa (G1311C), analitik kolon ACE 5 C18, 5 µm, 100 Å (250×4,60 mm) ve diyot dizisi dedektörü ile donatılmış (G1311D) ve 190-800 nm dalga boyu aralığına sahiptir. Enjeksiyon hacmi 20 µL, fırın sıcaklığı 25°C ve akış hızı 1.0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kullanılan mobil faz gradyanları şu şekildedir:

Su:asetik asit (98:2, % v:v) (A) / Asetonitril:asetik asit (99,5:0,5, % v:v) (B) / Asetonitril (C).

0-30 dakikada %90 (A), %10 (B) / 30-60 dakikada %80 (A), %20 (B) / 60-62 dakikada %55 (A), %45 (B) / 62-77 dakikada %40 (B), %60 (C) / 77-80 dakikada %90 (A), %10 (B).

Çalışmadan sonra, hareketli fazın başlangıç koşulları kolon stabilizasyonu için 5 dakika korunmuştur.

### **3.4 Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi**

Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol içeriklerinin belirlenmesi sürecinde, standart olarak gallik asit (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 1,0 ve 1,3 mM) kullanılmıştır. 400 mg/L konsantrasyondaki metanol ve su ekstraktları ve standartlardan 20 µL mikro plaka kuyucuklarına koyulmuştur. Üzerlerine 20 µL Folin reaktifi (2N) eklenmiş ve pipetajlama ile karıştırılan örnekler karanlıkta 3 dk inkübe edilmiştir. Ardından üzerlerine 20 µL sodyum karbonat (%15, w/v) ve 140 µL dH<sub>2</sub>O eklenerek 10 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. 725 nm'de spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Gallik asit ile oluşturulmuş standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplama gerçekleştirilmiştir.

### **3.5 Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi**

Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol içeriklerinin belirlenmesi sürecinde, standart olarak kuersetin (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mM) kullanılmıştır. 400 mg/L konsantrasyondaki metanol ve su ekstraktları ve standartlardan 50 µL mikropilaya kuyucuklarına koyulmuştur. Üzerlerine sırasıyla 215 µL etanol (%80, v/v), 5 µL AlNO<sub>3</sub> (%10, w/v) ve 5 µL potasyum asetat eklenmiştir. 40 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 415 nm'de spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Kuersetin ile oluşturulmuş standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak kuersetin eşdeğeri cinsinden hesaplama gerçekleştirilmiştir.

### **3.6 DPPH Üzerinden Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi**

Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının DPPH yakalama aktivitesi ölçümünde, ekstraktların plaka kuyucuklarındaki nihai konsantrasyonları 12,5, 25,

50, 100, 200 ve 400 mg/L olacak şekilde uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre, ekstraktlardan her bir mikro plaka kuyucuğuna 20 µL koyulmuş ve üzerlerine 180 µL DPPH (metanol içerisinde 0,06 mM) eklenmiştir. Karanlık ortamda 60 dk bekletildikten sonra 517 nm’de absorbans değerleri ölçülerek DPPH serbest radikalinin indirgenmesi belirlenmiştir (Şekil 3.3). Ekstraktların serbest radikal yakalama aktiviteleri yüzde olarak Formül 3.1’e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Radikal yakalama aktivitesi (\%)} = 100 \times \frac{\text{Kontrol absorbans değeri} - \text{Ekstrakt absorbans değeri}}{\text{Kontrol absorbans değeri}} \quad (3.1)$$

### 3.7 Metal Şelatlama Aktivitesi

Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi ölçümünde, ekstraktların plaka kuyucuklarındaki nihai konsantrasyonları 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L olacak şekilde uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre, ekstraktlardan her bir mikro plaka kuyucuğuna 50 µL eklenmiştir. Üzerlerine sırasıyla 10 µL ferrozin (5 mM), 5 µL FeCl<sub>2</sub> (2 mM) ve 185 µL metanol eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler 562 nm’de gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Ekstraktların metal şelatlama aktiviteleri yüzde olarak Formül 3.2’ye göre hesaplanmıştır:

$$\text{Metal şelatlama aktivitesi (\%)} = 100 \times \frac{\text{Kontrol absorbans değeri} - \text{Ekstrakt absorbans değeri}}{\text{Kontrol absorbans değeri}} \quad (3.2)$$

### 3.8 Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

İnsan meme kanser hücreleri (MCF-7) Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM), yüksek glikoz, L-glutamin, sodyum piruvat medyumuna %10 fetal bovin serumu (FBS) eklenmek suretiyle kültüre edilmiştir. Kültür sürecinde, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem inkübatörü (Sanyo MCO 17AIC, ABD) kullanılmıştır.

Hücreler istenen yoğunluğa (%90) ulaşıncaya tripsin/EDTA ile kaldırılmış ve taze besiyerleriyle yıkanmıştır. Tekrar büyüme ortamlarına alınan hücreler Tripan mavisi ile boyanmış hücre sayım cihazında (TC-10, Bio-RAD, Almanya) sayılmıştır.

### 3.9 Sitotoksosite Analizleri

Hücreler, 24 saat boyunca 37°C'de 96 kuyucuklu düz tabanlı mikro plakalara  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Daha sonra medyum, farklı bitki ekstraktı konsantrasyonları içeren taze bir ortam ile değiştirilmiştir. Kuyucuklardaki ekstraktların son konsantrasyonları 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L olarak ayarlanmış ve negatif kontrol grubu olarak %0,5'i dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüsü olacak şekilde, DMSO+uygulanan ilgili hücre kültürü medyumunu kullanılmıştır. 48 saatlik inkübasyondan sonra, 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) ve aktivatör reaktifleri, kit (Biological Industries, Beit Haemek, İsrail) prosedürüne göre her kuyucuğa eklenmiştir. Daha sonra plakalar 4 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile absorbans değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.3). Hücre canlılıklarının hesaplanması Formül 3.3 aracılığı ile gerçekleştirilmiştir:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = 100 \times \frac{\text{Örnek absorbans değeri}}{\text{Kontrol absorbans değeri}} \quad (3.3)$$



Şekil 3.3: Spektrofotometrik ölçümlerin gerçekleştirildiği mikrolaka okuyucu.

### 3.10 Verilerin Analizi

Uygulamalar neticesinde ortaya çıkan sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 21.0 istatistik veri paketi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde (%95 güven aralığında) post-hoc Duncan çoklu karşılaştırma testinden, değişkenler arasındaki yakınlık derecelerinin tespit edilmesinde ısı haritası ve Ward'ın minimum varyans hiyerarşik kümeleme analizinden ve IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması amacıyla Probit regresyon analizinden yararlanılmıştır.





## 4. BULGULAR

### 4.1 HPLC Analizi ile Bazı Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması ve Miktar Tayini

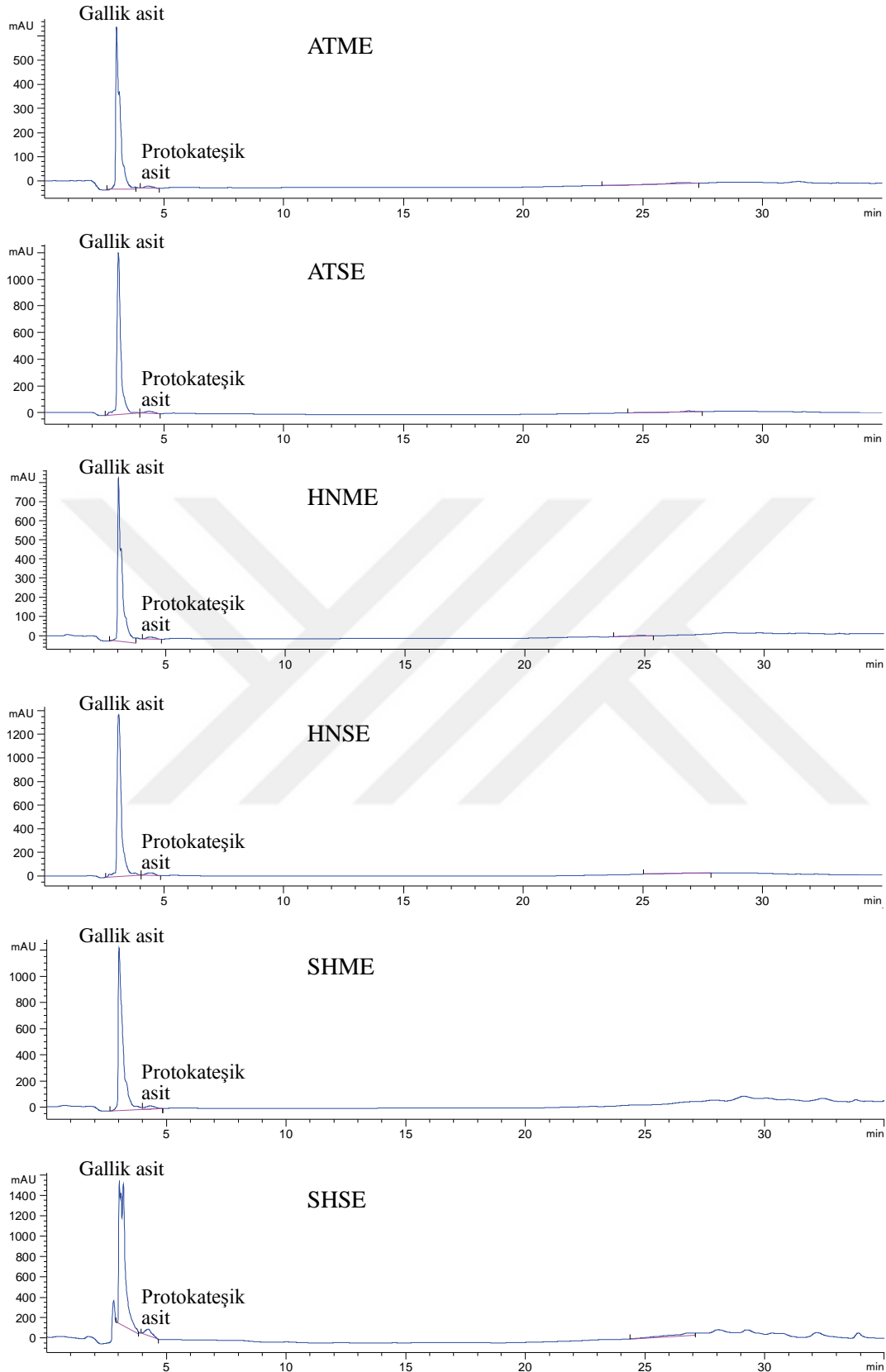
*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örneklerinin metanol ve su ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerden gallik asit ve protokateşik asit oranlarını belirlemek için HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilen ölçümler sonucu gallik asit ve protokateşik aside ait HPLC kromatogramları Şekil 4.1’de verilmiştir. İlgili kromatogramlar üzerinde gerçekleştirilen analizler sonucu *A. tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii*’den elde edilen metanol ve su ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin miktarları hesaplanmıştır.

Ekstraktlardaki gallik asit miktarı incelendiğinde, en yüksek oran 2469,16 µg/g ile SHSE’de tespit edilmiştir. Genel sıralama ise ATME < HNME < ATSE < SHME < HNSE < SHSE şeklinde ortaya çıkmıştır. Aynı bitkinin metanol ve su ekstraktı arasında kıyaslama yapıldığında, su ekstraktlarının metanole kıyasla daha yüksek oranda gallik aside sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Test edilen bitki ekstraktlarında bulunan protokateşik asit miktarı ele alındığında, SHSE’nin en yüksek orana sahip olduğu (128,87 µg/g) belirlenmiştir. İncelenen tüm ekstraktlardaki protokateşik asit miktarı için sıralama; ATME < HNME < ATSE < HNSE < SHME < SHSE şeklinde olmuştur. Aynı bitkinin metanol ve su ekstraktı arasında kıyaslama yapıldığında, gallik asit deneyine benzer şekilde, su ekstraktlarının metanole kıyasla daha yüksek oranda protokateşik aside sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1:** Test edilen bitki ekstraktlarının farklı fenolik bileşik miktarları (µg/g).

Fenolik bileşik	Dalga boyu (nm)	Ekstrakt					
		ATME	ATSE	HNME	HNSE	SHME	SHSE
Gallik asit	254	802,62	1369,34	1025,87	1747,18	1657,56	2469,16
Protokateşik asit	254	17,64	41,33	22,85	46,27	74,01	128,87



**Şekil 4.1:** Bitkilerden elde edilen ekstraktlar üzerinde 254 nm dalga boyundaki ölçümler sonucu ortaya çıkan HPLC kromatogramları.

## 4.2 Ekstraktların Antioksidan İçerik Analizleri

*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örneklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol içeriği standart olarak kullandığımız gallik asit eşdeğeri, toplam flavonoid içeriği ise standart olarak kullandığımız kuersetin eşdeğeri temel alınarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2).

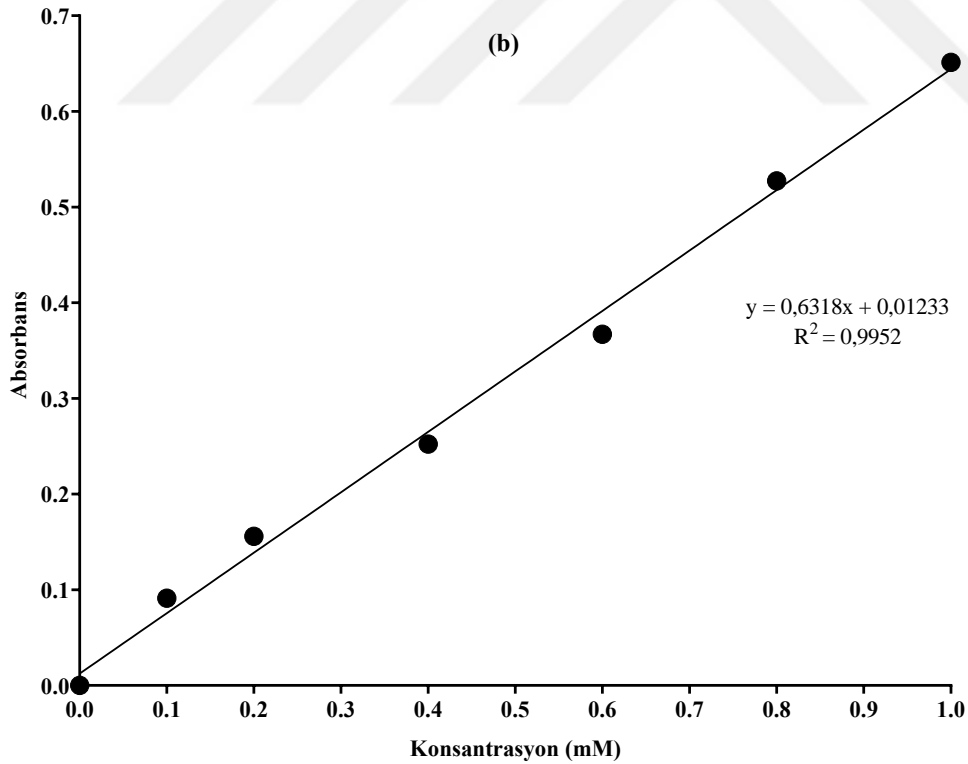
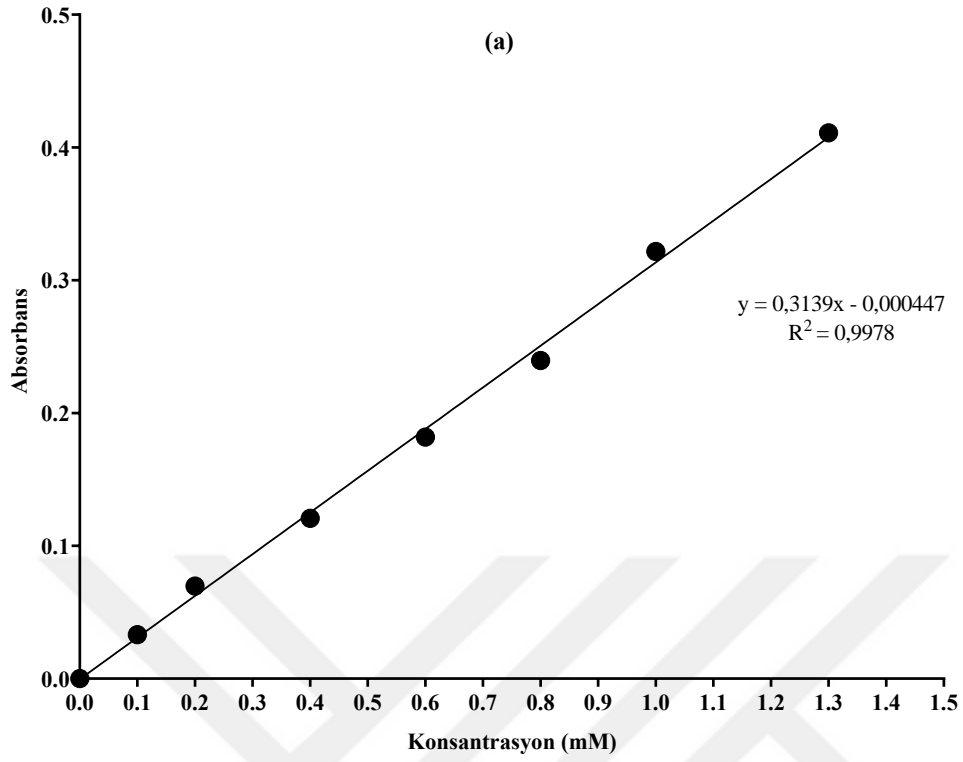
Toplam fenol içerikleri incelendiğinde, en yüksek oranın 116,34 µg gallik asit eşdeğeri/mg ekstrakt ile SHSE'ye ait olduğu görülmektedir. Ekstraktlar arasındaki genel sıralama ATME < ATSE < HNME < HNSE < SHME < SHSE şeklinde ortaya çıkmıştır. Aynı bitkinin metanol ve su ekstraktı arasında kıyaslama yapıldığında, su ekstraktlarının metanole kıyasla daha yüksek oranda toplam fenol içeriğine sahip olduğu göze çarpmaktadır. Ayrıca her bir ekstraktta bulunan toplam fenol oranının istatistiksel açıdan ( $p < 0,05$ ) birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Bitki ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid içerikleri ele alındığında, HNSE'nin en yüksek orana (83,39 µg kuersetin eşdeğeri/mg ekstrakt) sahip olduğu belirlenmiştir. İncelenen tüm ekstraktlardaki toplam flavonoid içerikleri için sıralama; ATME < ATSE < SHSE < HNME < SHME < HNSE şeklinde olmuştur. Aynı bitkinin metanol ve su ekstraktı arasında kıyaslama yapıldığında, *S. huber-morathii* ekstraktları hariç, su ekstraktlarının metanole kıyasla daha yüksek oranda toplam flavonoid içeriğine sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2:** Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoid içerikleri (µg/mg) (Ortalama ± Standart Sapma,  $n = 3$ ).

Ekstrakt	Toplam fenol (Gallik asit eşdeğeri)	Toplam flavonoid (Kuersetin eşdeğeri)
ATME	34,76 ± 0,53 f	16,53 ± 0,74 f
ATSE	55,72 ± 0,57 e	38,27 ± 1,05 e
HNME	84,75 ± 2,30 d	49,01 ± 0,58 c
HNSE	99,65 ± 1,36 c	83,39 ± 0,99 a
SHME	105,85 ± 2,13 b	71,11 ± 1,66 b
SHSE	116,34 ± 1,51 a	40,97 ± 1,14 d

Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.2:** (a) Toplam fenol içerik hesaplamasında standart olarak kullanılan gallik aside ait ve (b) toplam flavonoid içerik hesaplamasında standart olarak kullanılan kuersetine ait lineer regresyon grafikleri.

### 4.3 Ekstraktların DPPH Yakalama Aktiviteleri

*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örneklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamalarının DPPH yakalama aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir ekstrakt uygulaması için konsantrasyona bağlı aktivite artışı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

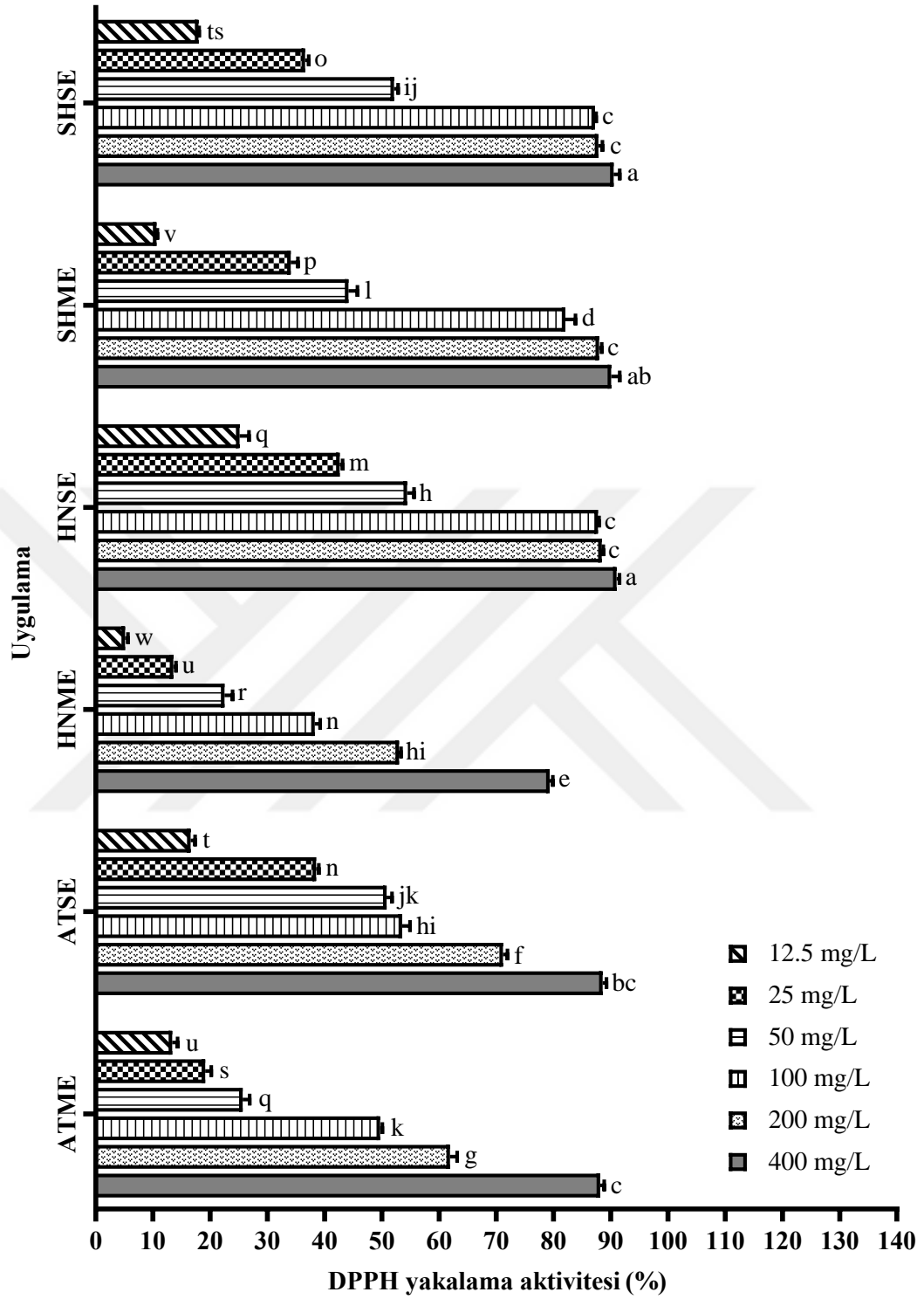
*Astragalus tokatensis*'ten elde edilen ekstraktlar incelendiğinde, ATME ve ATSE'nin maksimum konsantrasyonlu (400 mg/L) uygulamalarının sırasıyla %88,13 ve %88,57 oranında DPPH yakalama kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Aynı zamanda, bu iki oran arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz ( $p > 0,05$ ) bulunmuştur. En düşük veriler ise 12,5 mg/L'lik uygulamalarda ortaya çıkmıştır. ATME (%13,36) ve ATSE'nin (%16,57) ilgili konsantrasyonda sahip olduğu DPPH yakalama aktiviteleri arasında önemli derecede ( $p < 0,05$ ) fark vardır (Şekil 4.3). Etkinlik seviyelerini belirleme açısından önemli bir hesaplama olan  $IC_{50}$  değeri göz önüne alındığında, ATSE'nin gösterdiği daha düşük  $IC_{50}$  değeri (58,97 mg/L) ile ATME'ye ( $IC_{50}$ : 99,75 mg/L) kıyasla daha etkili bir uygulama olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.3).

*Helichrysum noeanum*'dan elde edilen ekstraktlar ele alındığında, HNSE'nin 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının tüm deney grubu içerisindeki en yüksek DPPH yakalama aktivitesine (%91,00) sahip olduğu görülmüştür. HNME de kendi içerisinde en yüksek oranı maksimum konsantrasyonda %79,33 oran ile göstermiştir. HNSE'nin 100 ve 200 mg/L'lik uygulamalarının ortaya çıkardığı DPPH yakalama oranları (sırasıyla %87,76 ve %88,43) arasında önemli derecede ( $p > 0,05$ ) fark bulunmamıştır. *H. noeanum* ekstraktları içerisinde en düşük veri (%5,11) HNME'nin 12,5 mg/L'lik uygulamasında belirlenmiş ve bu oran diğer verilere kıyasla önemli derecede ( $p < 0,05$ ) düşük olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda bu verinin DPPH yakalama aktivitesi için tasarlanan tüm deney seti içerisindeki en düşük oran olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).

$IC_{50}$  değerleri temel alındığında, tüm deney seti içerisindeki en düşük oranın (33,13 mg/L) HNSE'ye ait olduğu görülmektedir. Dolayısıyla HNSE'nin HNME için hesaplanan  $IC_{50}$  değerinden (147,75 mg/L) çok daha düşük bir orana sahip olmasından dolayı HNME'ye kıyasla daha etkili bir DPPH yakalama potansiyeline sahip olduğu göze çarpmaktadır (Çizelge 4.3).

*Stachys huber-morathii*'den elde edilen ekstraktlar göz önüne alındığında, tüm deney seti içerisindeki yüksek oranlara rastlanmıştır. SHME ve SHSE'nin maksimum konsantrasyonlu uygulamaları tarafından ortaya çıkan DPPH yakalama aktiviteleri (sırasıyla %90,05 ve %90,51) HNSE'den sonra hesaplanan en yüksek oranlar olarak dikkat çekmektedir. Bahsi geçen bu iki veri arasında istatistiksel olarak ( $p > 0,05$ ) önemli bir fark yoktur. İkinci yüksek konsantrasyon olan 200 mg/L'lik uygulamalar incelendiğinde, SHME ve SHSE'nin sırasıyla %87,94 ve %87,84 oranlarına sahip oldukları ve bu veriler arasında önemli derecede ( $p > 0,05$ ) fark bulunmadığı görülmektedir. Ek olarak, SHSE'nin 100 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının ortaya çıkardığı %87,24'lük DPPH yakalama aktivitesinin de 200 mg/L'lik uygulamalardan istatistiksel açıdan ( $p > 0,05$ ) farksız olduğu belirlenmiştir. *S. huber-morathii* ekstraktlarının ortaya çıkardığı en düşük oran (%10,60) SHME'nin 12,5 mg/L'lik uygulamasında tespit edilmiştir. Bu oran diğer tüm verilere kıyasla önemli derecede ( $p < 0,05$ ) farklı olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3). Ekstraktların tüm konsantrasyonları ele alınarak DPPH yakalama aktiviteleri için etkinlik düzeyleri incelendiğinde, SHSE'nin tüm deney seti içerisindeki ikinci en düşük  $IC_{50}$  değerine (39,81 mg/L) sahip olduğu görülmektedir. SHME'nin  $IC_{50}$  değeri (48,93 mg/L) de düşük bir oran olmakla birlikte SHSE'ye kıyasla daha yüksek olduğundan SHME'nin daha etkili bir DPPH yakalama potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.3).

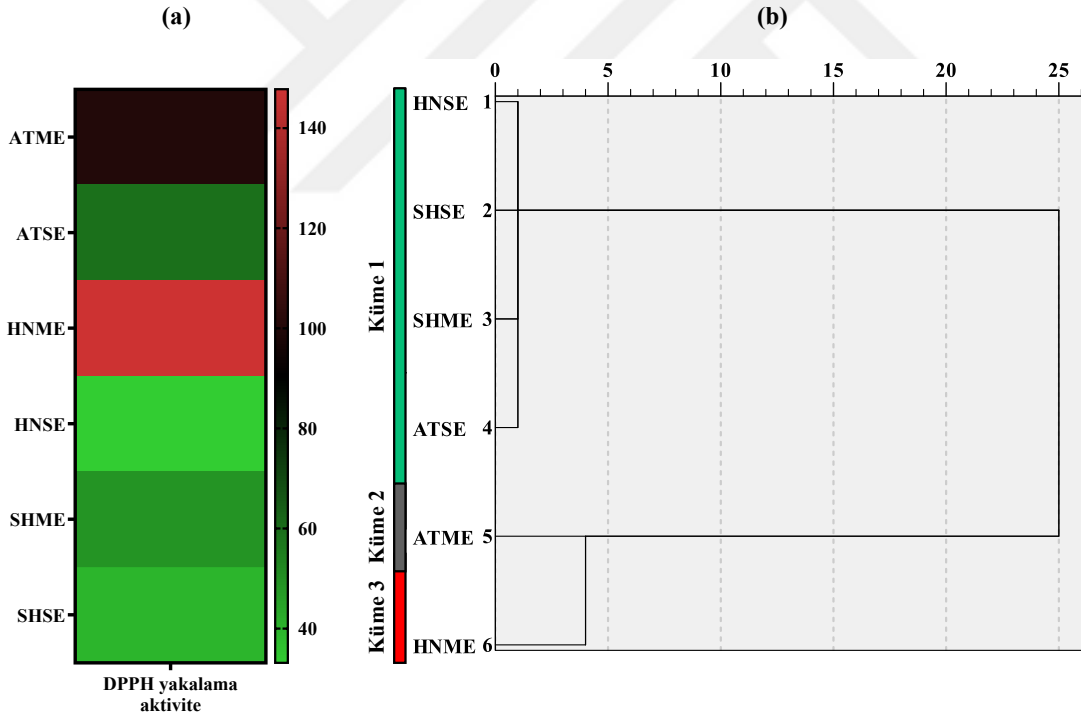
Ekstraktların DPPH yakalama aktiviteleri göz önüne alındığında,  $IC_{50}$  değerleri temel alınarak birbirlerine yakınlık dereceleri ısı haritası ve kümeleme analizleri aracılığı ile belirlenmiştir. Isı haritası analizinde yüksek değerler kırmızı, düşük değerler yeşil renk gradyanı ile gösterilmiştir. Bu kapsamda, kümeleme analizinde 3 kümeye bölünen ekstraktlardan Küme 3 altında yer alan HNME ısı haritası analizinde kırmızı renk gradyanına sahip olarak diğer ekstraktlardan ayrılmıştır. Benzer şekilde ATME orta renk gradyanı gösterip Küme 2 altında yer alan tek uygulama olmuştur. Daha düşük  $IC_{50}$  değerlerine sahip olan Küme 1 altındaki uygulamalar kendi içerisinde  $HNSE < SHSE < SHME < ATSE$  şeklinde sıralanmış ve birbirlerine yakınlık göstermişlerdir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.3:** Bitkilerden elde edilen ekstraktlara ait DPPH yakalama aktiviteleri (%) (Ortalama ± Standart Sapma,  $n = 3$ ) (Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir).

**Çizelge 4.3:** Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarına ait DPPH yakalama aktiviteleri için IC<sub>50</sub> değerleri (mg/L).

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> (Sınırlar)	Eğim ± Standard hata (Sınırlar)
ATME	99,75 (90,17–110,80)	1,48 ± 0,06 (1,34–1,61)
ATSE	58,97 (52,37–66,21)	1,23 ± 0,06 (1,10–1,36)
HNME	147,75 (133,12–165,31)	1,54 ± 0,07 (1,40–1,68)
HNSE	33,13 (29,51–36,87)	1,50 ± 0,07 (1,36–1,64)
SHME	48,93 (44,72–53,38)	1,79± 0,07 (1,64–1,94)
SHSE	39,81 (36,00–43,79)	1,65 ± 0,07 (1,51–1,80)



**Şekil 4.4:** (a) Bitki ekstraktlarının DPPH yakalama aktiviteleri için IC<sub>50</sub> değerleri temel alınarak oluşturulan ısı haritası (Yüksek aktiviteler kırmızı, düşük aktiviteler yeşil renkle gösterilmiştir) ve (b) dendrogram.

#### 4.4 Ekstraktların Metal Şelatlama Aktiviteleri

*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örneklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamalarının metal şelatlama aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir ekstrakt uygulaması için konsantrasyona bağlı aktivite artışı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

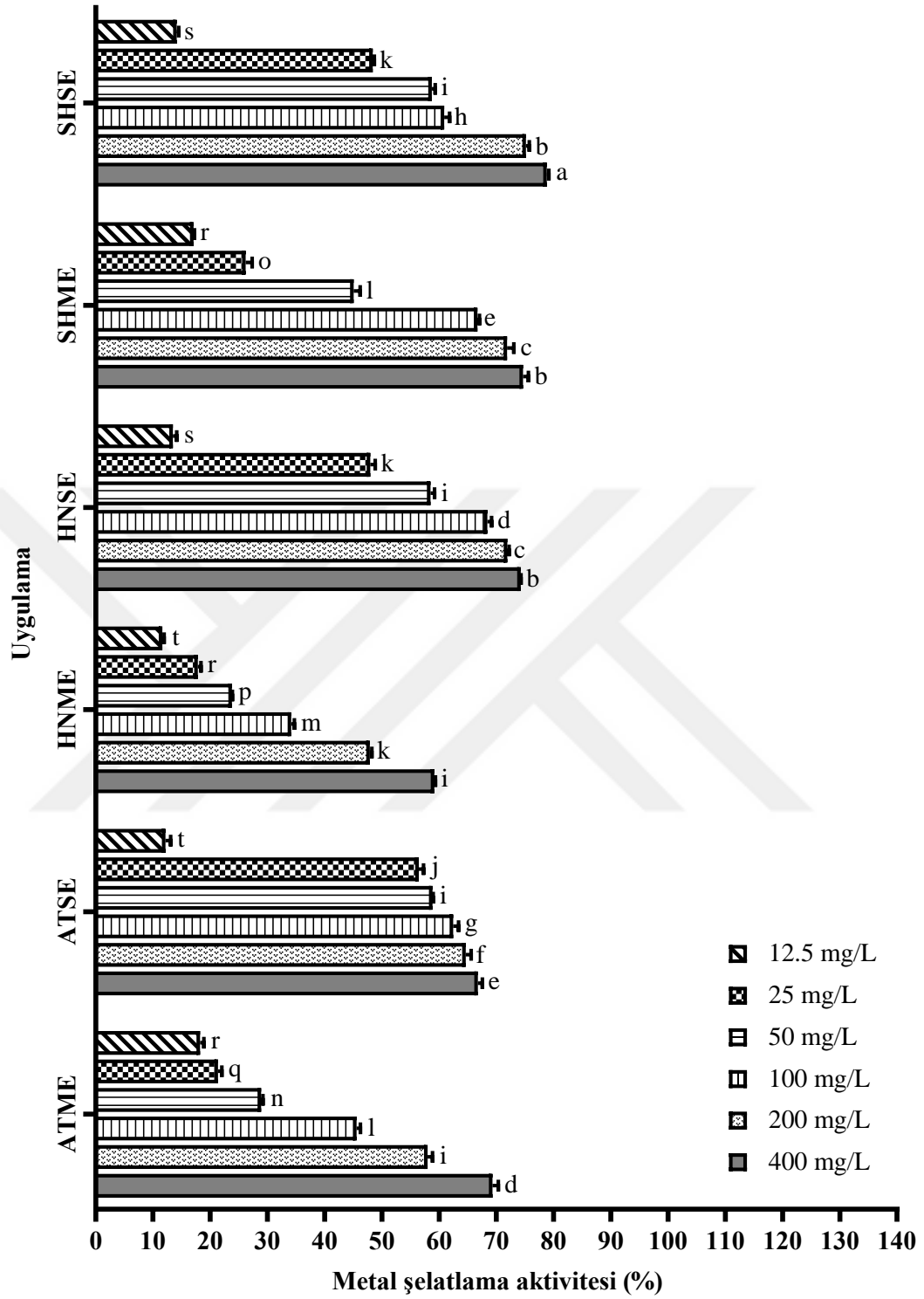
*Astragalus tokatensis*'ten elde edilen ekstraktlar incelendiğinde, ATME ve ATSE'nin maksimum konsantrasyonlu (400 mg/L) uygulamalarının sırasıyla %69,32 ve %66,76 oranında metal şelatlama kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Bahsi geçen bu iki ortalama arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu ortaya çıkmıştır. En düşük veriler ise 12,5 mg/L'lik uygulamalarda ortaya çıkmıştır. ATME (%18,21) ve ATSE'nin (%12,19) ilgili konsantrasyonda gösterdiği metal şelatlama aktivite ortalamaları arasında önemli derecede ( $p < 0,05$ ) fark vardır (Şekil 4.5). Etkinlik seviyelerini belirleme açısından önemli bir hesaplama olan  $IC_{50}$  değeri göz önüne alındığında, ATSE'nin gösterdiği daha düşük  $IC_{50}$  değeri (53,39 mg/L) ile ATME'ye ( $IC_{50}$ : 134,09 mg/L) kıyasla daha etkili bir uygulama olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.4).

*Helichrysum noeanum*'dan elde edilen ekstraktlar ele alındığında, HNSE'nin 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının deney grubu içerisindeki yüksek metal şelatlama oranlarından (%74,25) birine sahip olduğu görülmüştür. HNSE'nin 100 mg/L ve 200 mg/L'lik uygulamalarının gösterdiği sırasıyla %68,41 ve %71,88 oranları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu çalışma sonuçlarına yansımıştır. HNME de kendi içerisinde en yüksek oranı maksimum konsantrasyonda %59,13 oran ile göstermiştir. *H. noeanum* ekstraktları içerisinde en düşük veri (%11,65) HNME'nin 12,5 mg/L'lik uygulamasında belirlenmiş ve bu oran deney seti içerisindeki diğer tüm verilere kıyasla önemli derecede ( $p < 0,05$ ) düşük olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5).

$IC_{50}$  değerleri temel alındığında, tüm deney setinin en düşük ikinci verisine (49,10 mg/L) sahip olan HNSE'nin HNME'ye ( $IC_{50}$ : 240,76 mg/L) kıyasla daha etkili bir metal şelatör olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda, HNME'nin  $IC_{50}$  değerinin tüm deney seti içerisindeki en yüksek oran olması onun ekstrakt uygulamaları arasındaki en düşük metal şelatlama etki potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4).

*Stachys huber-morathii*'den elde edilen ekstraktlar göz önüne alındığında, SHSE'nin 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının tüm deney grubu içerisindeki en yüksek metal şelatlama aktivitesine (%78,79) sahip olduğu görülmüştür ve bu ortalama değer tüm deney setinde bulunan diğer verilerden önemli derecede ( $p < 0,05$ ) yüksektir. SHME'nin kendi içerisinde en yüksek oranı (%74,66) gösterdiği 400 mg/L'lik uygulama ile SHSE'nin 200 mg/L'lik uygulaması tarafından ortaya konan metal şelatlama aktivitesi (%75,14) arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir. Bahsi geçen bu iki veriye ek olarak HNSE'nin maksimum konsantrasyonlu uygulaması tarafından gösterilen %74,25 ortalamanın da bu iki veriden istatistiksel açıdan farksız olduğu tespit edilmiştir. *S. huber-morathii* ekstraktlarının ortaya çıkardığı en düşük oran (%14,12) SHSE'nin 12,5 mg/L'lik uygulamasında tespit edilmiştir. Tüm deney seti incelendiğinde, bu oran ile HNSE'nin 12,5 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının ortaya çıkardığı oran arasında önemli derecede ( $p > 0,05$ ) fark bulunmamıştır (Şekil 4.5). Ekstraktların tüm konsantrasyonları ele alınarak metal şelatlama aktiviteleri için etkinlik düzeyleri incelendiğinde, SHSE'nin tüm deney seti içerisindeki en düşük  $IC_{50}$  değerine (49,00 mg/L) sahip olduğu görülmektedir. SHME'nin  $IC_{50}$  değeri (70,22 mg/L) SHSE'ye kıyasla daha yüksek olduğundan SHSE'nin daha etkili bir metal şelatlama potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca tüm ekstraktlar için ortaya çıkan  $IC_{50}$  değerleri ele alındığında, SHME ve SHSE arasındaki farkın diğer uygulamalara kıyasla daha düşük olması dikkate değerdir (Çizelge 4.4).

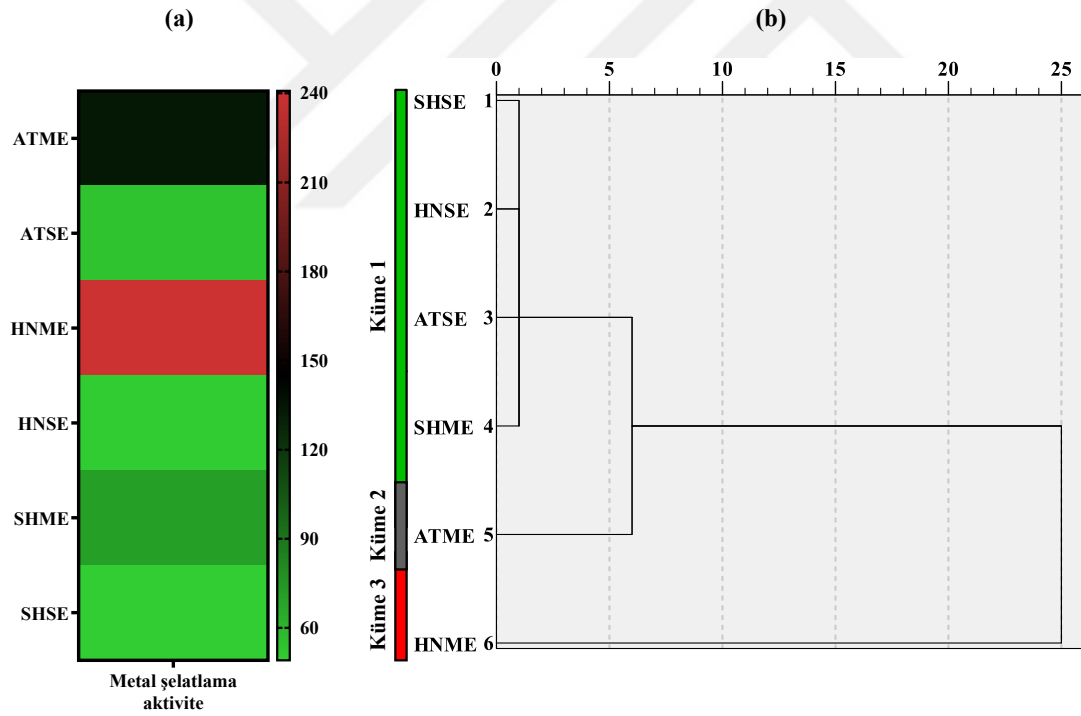
Ekstraktların metal şelatlama aktiviteleri göz önüne alındığında,  $IC_{50}$  değerleri temel alınarak birbirlerine yakınlık dereceleri ısı haritası ve kümeleme analizleri aracılığı ile belirlenmiştir. Isı haritası analizinde yüksek değerler kırmızı, düşük değerler yeşil renk gradyanı ile gösterilmiştir. Bu kapsamda, kümeleme analizinde 3 kümeye bölünen ekstraktlardan Küme 3 altında yer alan HNME ısı haritası analizinde kırmızı renk gradyanına sahip olarak diğer ekstraktlardan ayrılmıştır. Benzer şekilde ATME orta renk gradyanı gösterip Küme 2 altında yer alan tek uygulama olmuştur. Daha düşük  $IC_{50}$  değerlerine sahip olan Küme 1 altındaki uygulamalar kendi içerisinde SHSE < HNSE < ATSE < SHME şeklinde sıralanmış ve birbirlerine yakınlık göstermişlerdir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.5:** Bitkilerden elde edilen ekstraktlara ait metal şelatlama aktiviteleri (%) (Ortalama ± Standart Sapma,  $n = 3$ ) (Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir).

**Çizelge 4.4:** Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktlarına ait metal şelatlama aktiviteleri için IC<sub>50</sub> değerleri (mg/L).

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> (Sınırlar)	Eğim ± Standard hata (Sınırlar)
ATME	134,09 (115,65–158,02)	1,00 ± 0,06 (0,88–1,13)
ATSE	53,39 (43,82–64,13)	0,75 ± 0,06 (0,63–0,86)
HNME	240,76 (199,66–301,17)	0,96 ± 0,06 (0,83–1,09)
HNSE	49,10 (42,13–56,65)	0,99 ± 0,06 (0,87–1,11)
SHME	70,22 (62,11–79,34)	1,16 ± 0,06 (1,04–1,29)
SHSE	49,00 (42,45–56,07)	1,06 ± 0,06 (0,93–1,18)



**Şekil 4.6:** (a) Bitki ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri için IC<sub>50</sub> değerleri temel alınarak oluşturulan ısı haritası (Yüksek aktiviteler kırmızı, düşük aktiviteler yeşil renkle gösterilmiştir) ve (b) dendrogram.

#### 4.5 Hücrelerde Canlılık Oranının Belirlenmesi

*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örneklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksosite düzeyleri belirlenmiştir. Her bir ekstrakt uygulaması için konsantrasyon ile hücre canlılığı arasında negatif korelasyon belirlenmiştir (Şekil 4.7).

*Astragalus tokatensis*'ten elde edilen ekstraktlar incelendiğinde, ATME ve ATSE'nin maksimum konsantrasyonlu (400 mg/L) uygulamalarının hücre canlılıklarını sırasıyla %43,22 ve %39,23 seviyesine düşürdükleri belirlenmiştir. Bahsi geçen bu iki ortalama arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu ortaya çıkmıştır. En yüksek hücre canlılık oranına sebep olan uygulamalar ise 12,5 mg/L'lik konsantrasyonlardır. ATME (%91,94) ve ATSE'nin (%93,65) ilgili konsantrasyonda sebep olduğu hücre canlılık oranları arasında önemli derecede ( $p < 0,05$ ) fark vardır (Şekil 4.7).

Sitotoksik etkinlik düzeylerini belirleme açısından önemli bir hesaplama olan  $IC_{50}$  değeri göz önüne alındığında, ATSE'nin gösterdiği daha düşük  $IC_{50}$  değeri (206,94 mg/L) ile ATME'ye ( $IC_{50}$ : 239,33 mg/L) kıyasla daha etkili bir uygulama olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda, ATME'nin  $IC_{50}$  değerinin tüm deney seti içerisindeki en yüksek oran olması onun ekstrakt uygulamaları arasındaki en düşük sitotoksik etki potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.5).

*Helichrysum noeanum*'dan elde edilen ekstraktlar ele alındığında, HNSE'nin 400 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının tüm deney grubu içerisindeki hücre canlılık oranını (%23,84) en fazla düşüren ikinci uygulama olduğu görülmüştür. HNSE'nin 100 mg/L ve 200 mg/L'lik uygulamalarının sebep olduğu sırasıyla %46,85 ve %34,58 canlılık oranları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu çalışma sonuçlarına yansımıştır. HNME de kendi içerisinde en düşük canlılık oranı maksimum konsantrasyonda %37,75 ile göstermiştir. Ek olarak, HNME ve HNSE'nin 100 mg/L'lik uygulamalarının ortaya çıkardığı canlılık oranları (sırasıyla %46,77 ve %46,85) arasında önemli düzeyde ( $p > 0,05$ ) farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.7).

$IC_{50}$  değerleri temel alındığında, tüm deney setinin en düşük verisine (96,94 mg/L) sahip olan HNSE'nin HNME'ye ( $IC_{50}$ : 163,25 mg/L) kıyasla MCF-7 hücreleri

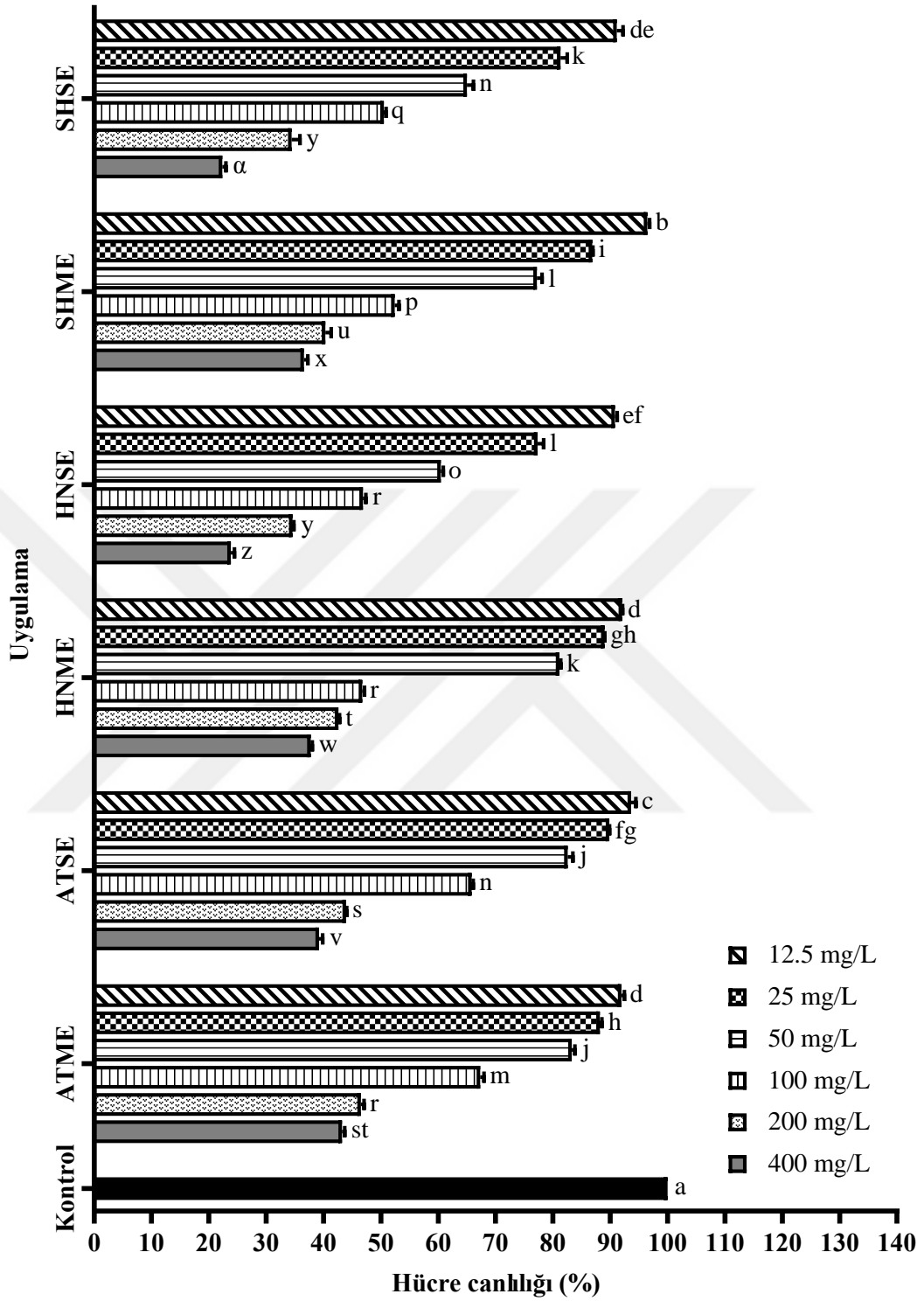
üzerinde daha etkili sitotoksik potansiyele sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5).

*Stachys huber-morathii*'den elde edilen ekstraktlar göz önüne alındığında, SHSE'nin 400 mg/L'lik konsantrasyonunun tüm deney grubu içerisindeki en düşük canlılık oranına (%22,33) sebep olan uygulama olduğu görülmüştür ve bu ortalama değer tüm deney setinde bulunan diğer verilerden önemli derecede ( $p < 0,05$ ) düşüktür. SHME'nin kendi içerisinde en düşük oranı (%36,58) gösterdiği uygulama ise 400 mg/L'lik konsantrasyon olmuştur. Bahsi geçen bu veri de diğer tüm oranlardan istatistiksel ( $p < 0,05$ ) olarak farklılık göstermiştir. *S. huber-morathii* ekstraktları içerisinde en yüksek veri (%96,48) SHME'nin 12,5 mg/L'lik uygulamasında belirlenmiş ve bu oran deney seti içerisindeki diğer tüm verilere kıyasla önemli derecede ( $p < 0,05$ ) yüksek olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).

Ekstraktların tüm konsantrasyonları ele alınarak sitotoksik aktiviteler için etkinlik düzeyleri incelendiğinde, SHSE'nin tüm deney seti içerisindeki en düşük ikinci IC<sub>50</sub> değerine (104,99 mg/L) sahip olduğu görülmektedir. SHME'nin IC<sub>50</sub> değeri (159,20 mg/L) SHSE'ye kıyasla daha yüksek olduğundan SHSE'nin daha etkili sitotoksik etki gösterme potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkmıştır. (Çizelge 4.5).

Genel olarak kontrol grubuna göre bir kıyaslama yapıldığında, farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt uygulamalarının tümünün MCF-7 hücreleri üzerinde önemli derecede ( $p < 0,05$ ) düşük canlılık oranlarına sebep oldukları çalışma sonuçlarına yansımıştır (Şekil 4.7).

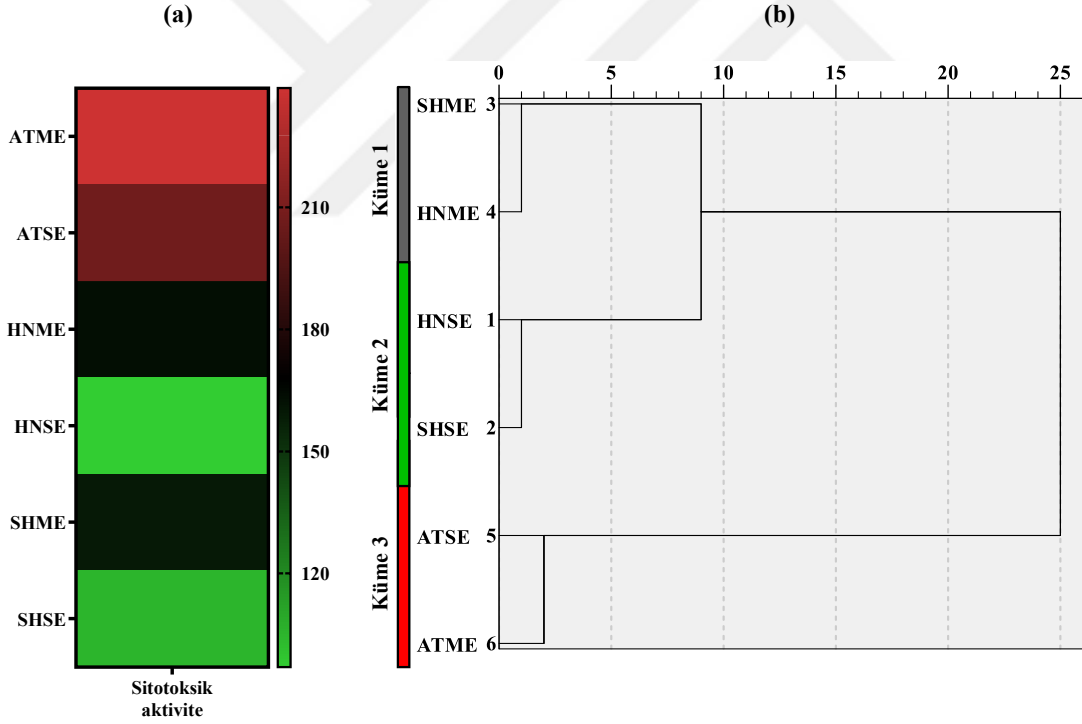
Ekstraktların sitotoksik aktiviteleri göz önüne alındığında, IC<sub>50</sub> değerleri temel alınarak birbirlerine yakınlık dereceleri ısı haritası ve kümeleme analizleri aracılığı ile belirlenmiştir. Isı haritası analizinde yüksek değerler kırmızı, düşük değerler yeşil renk gradyanı ile gösterilmiştir. Bu kapsamda, kümeleme analizinde 3 kümeye bölünen ekstraktlardan Küme 3 altında yer alan ATSE ve ATME ısı haritası analizinde kırmızı renk gradyanına sahip olarak diğer ekstraktlardan ayrılmıştır. SHME ve HNME orta renk gradyanı gösterip Küme 1 altında yer alan iki uygulama olmuştur. Daha düşük IC<sub>50</sub> değeri göstergesi olarak yeşil renk gradyanına sahip olan HNSE ve SHSE ise Küme 2 altında yer alarak birbirine yakınlık göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7: Bitkilerden elde edilen ekstraktlar ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde canlılık oranları (%) (Ortalama ± Standart Sapma,  $n = 3$ ) (Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir).

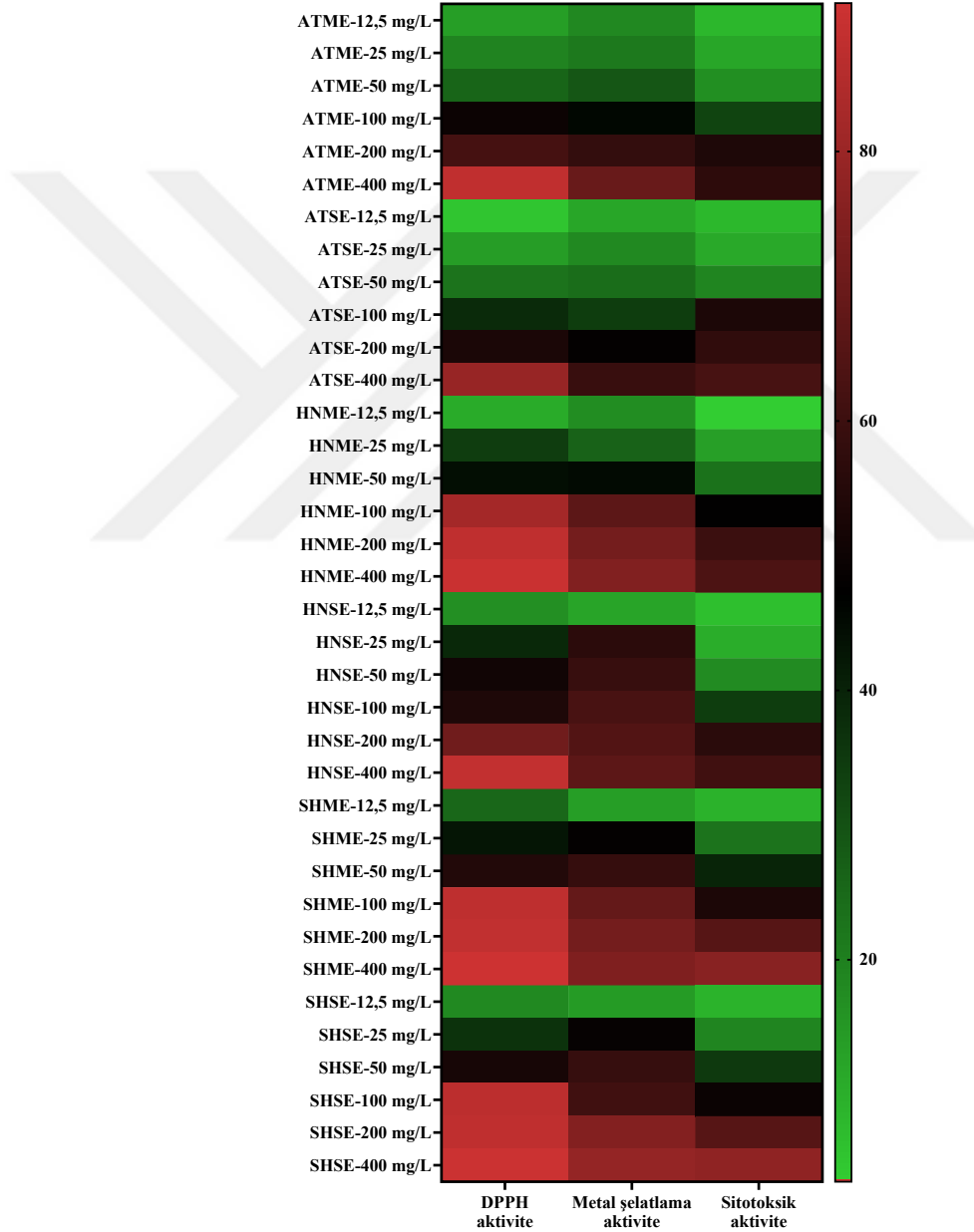
**Çizelge 4.5:** Bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstraktları ile muamele edilen MCF-7 hücreleri için tespit edilen IC<sub>50</sub> değerleri (mg/L).

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> (Sınırlar)	Eğim ± Standard hata (Sınırlar)
ATME	239,33 (204,97–286,47)	1,17 ± 0,07 (1,04–1,31)
ATSE	206,94 (181,44–240,03)	1,32 ± 0,07 (1,18–1,47)
HNME	163,25 (144,34–186,97)	1,30 ± 0,06 (1,16–1,44)
HNSE	96,94 (86,68–108,88)	1,29 ± 0,06 (1,16–1,43)
SHME	159,20 (141,89–180,53)	1,39 ± 0,07 (1,25–1,53)
SHSE	104,99 (94,40–117,34)	1,39 ± 0,06 (1,25–1,52)



**Şekil 4.8:** (a) Bitki ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri için IC<sub>50</sub> değerleri temel alınarak oluşturulan ısı haritası (Yüksek aktiviteler kırmızı, düşük aktiviteler yeşil renkle gösterilmiştir) ve (b) dendrogram.

Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının yüzde DPPH, metal şelatlama ve sitotoksik aktiviteleri birlikte ele alındığında, ilgili konsantrasyonlarda aktivitelerin birbirine yakınlık seviyeleri ısı haritası analizi aracılığı ile belirlenmiştir. Bu analiz sayesinde bahsi geçen üç aktivitenin de yüksek veya düşük oranlarına sahip olan uygulamalar hakkında fikir sahibi olunmuştur. Bu doğrultuda, üç aktivitenin de yüksek oranlarının görüldüğü uygulamalar içerisinde tüm ekstraktların maksimum konsantrasyonlu (400 mg/L) uygulamaları dikkat çekmiştir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının yüzde DPPH, metal şelatlama ve sitotoksik aktivitelerinin ısı haritası (Yüksek aktiviteler kırmızı, düşük aktiviteler yeşil renkle gösterilmiştir).



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde bazı hastalıkların tedavi sürecinde sentetik ürünlerin kullanımı ile canlı üzerinde yararlı etkilerin yanı sıra zararlı etkilerin meydana gelmesi bilim insanlarını farklı arayışlara sevk etmiştir. Bu kapsamda, bitkilerden elde edilen doğal bileşikler üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmıştır (Lakshmi ve diğerleri, 2021; Markiewicz-Żukowska ve diğerleri, 2013; Pandey ve diğerleri, 2018). Bitkilerden sentezlenen fenolik bileşikler, flavonoidler, karotenoidler ve vitaminler gibi önemli antioksidan kaynakları birçok çalışmanın içeriğini oluşturmuştur. Yapılan araştırmaların çoğunda çeşitli bitkisel ürünler ve sekonder metabolitlerin işlevinden sorumlu süreçler tanımlanmış ve böylece belirli hastalıklarda spesifik fitokimyasalların kullanımı teşvik edilmiştir (Bettaieb Rebey ve diğerleri, 2018; Grujić ve diğerleri, 2014; McKay ve diğerleri, 2015)

Popüler diyetlerde yeşil çay içmenin ve sebze-meyve ağırlıklı beslenmenin yaşam süresini uzattığı iddia edilmektedir. Bilimsel incelemeler organik sentez yoluyla oluşturulan bileşiklerin potansiyeli üzerine eğilmektedir. Birçok zorlu koşulda hayatta kalmayı sağlayan fitokimyasalların yeni farmasötik ilaç olabilme potansiyeli kimyasal bir perspektiften süzülerek anlaşılabilir (Kamdem ve diğerleri, 2016; Quideau ve diğerleri, 2011; Saleem ve diğerleri, 2021).

Mevcut tez çalışmasında kullandığımız *Astragalus*, *Helichrysum* ve *Stachys* cinslerine ait farklı bilimsel çalışmalar göze çarpmaktadır. *Astragali radix*'in önemli bir biyoaktif bileşeni olan *Astragalus* polisakkaritleri, immün düzenleyici, antitümör, anti-inflamatuar, antiviral ve diğer aktiviteler dahil olmak üzere önemli farmakolojik aktiviteler göstermektedir (Wang ve diğerleri, 2018). Lamiaceae familyasından polar fraksiyonun bileşenlerini esas olarak biyosentezleyen *Stachys* türlerinin biyolojik aktivitelerinde antioksidan karakterler saptanmıştır (Bendif, 2021). *Stachys* türleri geleneksel olarak enfeksiyon, astım, yaralar, tümörler, romatizmal ve iltihabi hastalıklar, öksürük ve ülser tedavisinde kullanılmaktadır (Öztürk ve diğerleri, 2016). Asteraceae familyasına dahil olan *Helichrysum* cinsi bitkiler en az 2000 yıldır geleneksel tıpta kullanılmaktadır. *Helichrysum* spp.'dan biyoaktif bileşikler için

çeşitli farmakolojik aktiviteler, özellikle de prenil edilmiş heterodimerik floroglusinil a-piron türevi olarak arzanol rapor edilmiştir. Arzanolün anti-inflamatuar, anti-HIV, antioksidan, antibiyotik, anti-kanser ve antiviral aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Akaberi ve diğerleri, 2019).

Tez çalışmamızda kullandığımız *Astragalus tokatensis*, *Helichrysum noeanum* ve *Stachys huber-morathii* örneklerinin HPLC analizinde örnek bitki türlerindeki su ve metanol ekstraktları için ayrı ayrı fenolik bileşiklerden gallik asit ve protokateşik asit oranları belirlenmiştir. Aynı bitkinin su ve metanol ekstraktları kıyaslandığında hem gallik asit hem protokateşik asit miktarı için su ekstraktlarının daha yüksek oranda bu iki fenolik bileşiğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Gallik asit ve protokateşik asitin en yüksek oranda bulunduğu ekstraktın SHSE olduğu saptanmıştır. HPLC analizi sonuçlarını destekleyen bir diğer analiz toplam fenolik içeriğidir. Ekstraktların antioksidan içeriği analizlerinde fenol içeriği için standart olarak gallik asit eşdeğeri, flavonoid içeriği için standart olarak kuersetin eşdeğeri temel alınıp hesaplamalar yapılmıştır. Aynı bitkinin metanol ve su ekstraktları karşılaştırıldığında su ekstraktlarında daha fazla fenolik içerik olduğu anlaşılmıştır. Aynı bitkinin metanol ve su ekstraktları arasında kıyaslama yapıldığında *S. huber-morathii* ekstraktları hariç su ekstraktlarının metanole oranla daha fazla flavonoid içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir.

*Astragalus tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* örneklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının DPPH yakalama ve metal şelatlama aktivitelerinde konsantrasyona bağlı bir artış belirlenmiştir. Ayrıca IC<sub>50</sub> değerleri temel alındığında, bu aktiviteler ile bitkinin toplam fenolik içeriği arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Bitkinin fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi arasındaki ilişkinin tespit edildiği farklı araştırmalar da literatürde mevcuttur (Haddouchi ve diğerleri, 2014; Sadeghi ve diğerleri, 2022). Test edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlu uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik düzeyleri belirlenirken konsantrasyon azaldıkça sitotoksik etkinin de azaldığı saptanmıştır. Hesaplanan IC<sub>50</sub> değerine göre en etkili sitotoksik aktivite HNSE'de gözlemlenmiştir. ATSE hariç su ekstraktlarında sitotoksik aktivitenin yüksek olduğu kanaatine varılmaktadır. Su çözücüsünün fenolik ve flavonoid bileşikleri daha iyi çözmesi ve böylece derişimi artan bu bileşikler aracılığı ile sitotoksik etkinin yükselmesi fikri ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamıza göre HNSE'nin tüm ekstraktlar içerisinde en güçlü DPPH yakalayıcı ve sitotoksik potansiyele sahip olan uygulama olduğu ortaya çıkmıştır. Bu etkiler muhtemelen yüksek fenolik asit ve flavonoid içeriği ile ilişkilidir. Bu nedenle, *Helichyrsium* cinsi bitkiler potansiyel bir doğal biyoaktif bileşik kaynağı olarak kabul edilebilir (Kherbache ve diğerleri, 2020). SHSE'nin ise deney grubu içerisindeki en güçlü metal şelatör olduğu saptanmıştır. Metal şelatlama aktivitesindeki oran çalışılan bitkinin güçlü bir antioksidan olduğunu göstermektedir. SHSE'de metal şelatlama kapasitesinin yüksek oluşu içerdiği fenolik bileşiklerin kapasitesinden kaynaklanıyor olabilir. Toplam fenol ve flavonoid analizlerine göre en fazla fenol ve flavonoid içeren ekstraktlar yine *H. noeanum* ve *S. huber-morathii* türlerine ait ekstraktlardır. Toplam fenolik bileşik ve flavonoid miktarı arttıkça antioksidan aktivite, metal şelatlama aktivitesi ve sitotoksitenin arttığına yönelik kanıtlar da literatürde mevcuttur (Nasrollahi ve diğerleri, 2019). Fenolik bileşikler ve flavonoidler polar çözücü olan suda daha iyi çözünmüş ve daha yüksek aktivite göstermiştir. Nitekim bu türlerin su ekstraktları araştırılan biyolojik aktiviteler yönünden metanol ekstraktına göre daha verimli olmuştur (Keskin, 2009).

Tez çalışması kapsamında kullanılan *A. tokatensis* endemik bitki türünün cinsine ait farklı biyolojik aktivite ölçümleri geçmişte yapılmıştır. *Astragalus spinosis*'ten elde edilen polisakkarit ekstrakt üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, ekstraktın fizikokimyasal karakterleri incelenmiş ve ilgili ekstraktın anti-lipaz ve antioksidan kapasite gösterdiği belirlenmiştir (Khaled ve Nayeem, 2021). Dört farklı endemik *Astragalus* cinsinin metanol ekstraktlarının orta düzeyde antioksidan aktivite sergilediği ve doğal antioksidan ajanlara ihtiyaç duyan gıda veya tıbbi uygulamalarda kullanılabilir olduğu farklı bir araştırmada ortaya çıkarılmıştır (Albayrak ve Kaya, 2019). Bir diğer çalışmada, *Astragalus lycius*'dan izole edilen sekiz farklı sekonder metabolitin altısının insan kolon kanserine karşı önemli sitotoksik aktivite sergilediği bildirilmiştir (Horo ve diğerleri, 2016). Ghaffari ve diğerleri (2021), *Astragalus creticus*'un diklorometan ve metanol ekstraktlarının sitotoksik, immünomodülatör ve antiinflamatuvar etkiler gösterdiğini ve bu bulguların, bitkinin geleneksel tıbbi kullanımını için bilimsel doğrulama sağladığını belirtmişlerdir. Wu ve diğerleri (2021), *A. membranaceus*'dan izole edilen metilnissolin-3-O-β-D-glukopiranozitin hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sebep olduğu oksidatif stresi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen sitotoksitenin önemli ölçüde düşürdüklerini tespit etmişlerdir. Gecibesler ve diğerleri (2017)'nin

çalışmasında, *Astragalus sinicus* L. tohumunun aseton ekstraktı ve *Astragalus mongholicus*'un su ekstraktındaki antioksidan kapasite sentetik bir antioksidan (bütil hidroksi toluen) ve enzimatik bir antioksidan (vitamin E) ile kıyaslanmıştır. Özellikle *A. mongholicus*'un su ekstraktı çeşitli antioksidan analizlerinde oldukça yüksek antioksidatif kapasite göstermiştir. Bir diğer çalışmada, *Astragalus armatus* Willd'un etil asetat ve bütanol ekstraktları çeşitli antioksidan aktivite tayini testlerine tabii tutulmuştur (Labeed ve diğerleri, 2016). Etil asetat ekstraktı daha başarılı antioksidan aktivite sergilemiştir. Etil asetat ekstraktının yüksek antioksidan aktivitesini isorhamnetinin varlığına bağlayan araştırmacılar, bütanol ekstraktından izole edilen flavonoidlerin glikosile edilmesinden dolayı antioksidan aktivitesinin daha az olduğunu düşünmüşlerdir. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.'un kök yaprakları ile gerçekleştirilen bir çalışmada, ilgili yapraklar yeşil çay işleme teknolojisi kullanılarak çay haline getirilmiş ve bu materyalin antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir (Samuel ve diğerleri, 2021). Sonuç olarak, *A. membranaceus*'un yüksek biyoaktif bileşenlere, güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu ve yan ürün olan bitki yapraklarından çay üretilerek bitkiden ekonomik ve makul bir şekilde yararlanmanın uygun olacağı kanaatine varılmıştır. Khan ve diğerleri (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *A. membranaceus* kökünün su ve metanol ekstraktlarının antiviral aktiviteye sahip olduğu ve güvenli olan konsantrasyonlarının Avian influenza H9 virüs enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ek olarak, *Astragalus* cinsi bitkilerin güçlü anti-tümör (Zengin ve diğerleri, 2022), anti-diyabetik ve anti-Alzheimer (Lekmine ve diğerleri, 2020) etkilerinin olduğuna dair araştırmalar da geçmişte bilim insanları tarafından ortaya konmuştur.

Tez çalışması kapsamında kullanılan *H. noeanum* endemik bitki türünün cinsine ait farklı biyolojik aktivite ölçümleri geçmişte gerçekleştirilmiştir. Jahromi ve diğerleri (2017)'nin çalışmasında, *Helichrysum leucocephalum*'un kök üstü kısımlarının etanolik ekstraktının içeriği, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Bitkinin etanol ekstraktının DPPH yakalama aktivitesi ve metal şelatlama kapasitesine bakıldığında önemli bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *H. leucocephalum*'un antifungal ve antibiyotik aktivitelere de sahip olduğu açıklanmıştır. Acimović ve diğerleri (2021), *H. italicum* ekstraktının dört farklı antioksidan (DPPH ve ABTS testleri, indirgeme gücü ve  $\beta$ -karoten

ağartma testi), antimikrobiyal, *in vitro* antihiperglisemik ve antiinflamatuvar kapasitelerini değerlendirilmiştir. Uygulanan tüm testler, *H. italicum*'un kompleks bir kimyasal içeriğe ve iyi bir biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada, *Helichrysum pamphylicum*'un toprak üstü kısımlarında bulunan açık ve kapalı çiçekleri ile gerçekleştirilen ekstraktların güçlü antioksidan, orta düzeyde antiinflamatuvar, kuvvetli CD73 (ekto-5'-nükleotidaz) enzim inhibisyonu ve antitümöral aktivite gösterdiği açıklanmıştır (Çimik, 2022). N. Işık (2020), *Helichrysum pallasii*'nin yapraklarının etanol ekstraktında antioksidan aktivitenin oldukça yüksek olduğunu kanıtlamıştır. Bu sonucu etanolün fenolik bileşikler daha iyi çözmesi ve ekstraktta antioksidan kapasitenin artmış olması ile açıklamıştır. Mari ve diğerleri (2014)'nin çalışmasında *Helichrysum italicum*'un çiçeklerinin metanol ekstraktından kantitatif testlerle on dört bileşik izole edilmiştir. Bu bileşikler için antioksidan, antibakteriyel, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, analjezikten, antiproliferatif, antimetastatik ve vazoprotektif aktivitelere kadar çok farklı biyolojik aktiviteler rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda, bitkinin farmakoloji alanında yararlanılabilecek bir tür olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan *S. huber-morathii* endemik bitki türünün cinsine ait farklı biyolojik aktivite ölçümleri geçmişte gerçekleştirilmiştir. Latresh (2017)'in çalışmasında *Stachys cretica* ile metanol ekstraktı hazırlanıp fenolik bileşik ve flavonoid miktarları test edilmiştir. Analiz edilen fraksiyonlar için antioksidan aktivitenin yüksek fenolik bileşik içerme durumu ile doğru orantılı olduğu sonucuna varılmıştır. Dörtkardeş (2019), endemik *Stachys mardinensis* bitkisinin canlı ve kurutulmuş formunu %80'lik metanol, etanol ve kaynatılıp soğutulmuş su ekstraksiyonunu gerçekleştirmiştir. Ekstraktları antioksidan aktivite deneylerine tabii tutup kıyaslama yaparak yorumlamıştır. Araştırmacı çalışmaya göre kuru formdan üretilen ekstraktların antioksidan aktivitede başarılı olduğunu, bu durumun sebebini ise bitkinin içerdiği fenolik bileşiklerin fazla miktar ve çeşitte oluşu ile açıklamıştır. Abdulgader Ali (2017), *Stachys cretica*'nın metanol ekstraktında bitkinin fenolik bileşiklerini ve flavonoidlerini değerlendirip tıbbi potansiyelini kavramak için görüş sunmuştur. Bu çalışmadaki deneysel sonuçlar ışığında araştırmacı, *S. cretica* ekstraktının glutatyon-S-transferaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin %100 olduğunu, ilaç direncini önlemek için bu antioksidan özellikleri kemoterapötiklerle birlikte kullanma avantajını savunmuştur. Diğer yandan, süperoksit dismutaz

üzerindeki %80, katalaz üzerindeki %90'dan daha düşük inhibisyon etkileri ekstraktın antioksidan potansiyelinin yüksek olduğunu ve vücudu oksidatif hasarlardan koruyabileceğini ortaya çıkarmıştır. *Stachys* cinsinin üç türünün (*S. byzantina*, *S. officinalis*, *S. sylvatica*) aromatik profil ve toplam polifenol içeriğinin yanı sıra antibakteriyel aktivite ve antioksidan kapasiteleri başka bir çalışmada araştırılmıştır (Stegäruş ve diğerleri, 2021). Su ekstraktları elde edilen üç *Stachys* türünde de antioksidan kapasitenin yüksek olduğu fakat en yüksek kapasiteyi *S. officinalis*'in gösterdiğini açıklayan araştırmacılar yaptıkları antimikrobiyal testlerde, *S. byzantine*, *S. officinalis* ve *S. sylvatica* ekstraktlarının özellikle Gram pozitif mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini, etkinin Gram negatif olanlarda daha düşük olduğunu açıklamışlardır. Shakeri ve diğerleri (2019)'nin çalışmasında *Stachys parviflora*'nın metanolik ekstraktı ve uçucu yağının kimyasal bileşimi, antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Yapılan antioksidan aktivite belirleme yöntemlerine göre ilgili ekstrakt güçlü antioksidan aktivite sergilemiştir. Araştırmacılar antioksidan aktivite kaynağının fenolik asitlerin ve flavonoid türevlerinin çeşit ve derişimi ile ilgili olduğunu düşünmüşlerdir. Ek olarak, *S. parviflora*'nın metanolik ekstraktı insan yumurtalık kanseri (A2780), insan kolon kanseri (HCT) ve fare melanom (B16F10) hücrelerine karşı anti-proliferatif etki göstermiştir.

Çalışmamızda kullandığımız üç endemik bitki türü olan *A. tokatensis*, *H. noeanum* ve *S. huber-morathii*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının DPHH radikal yakalama, metal şelatlama ve sitotoksik aktiviteleri arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek derişimli fraksiyonlardan çok daha etkili aktivite sonucu elde edilmiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında ele alınan endemik bitkilerden özellikle *H. noeanum* ve *S. huber-morathii*'den elde edilen su ekstraktlarının yüksek antioksidan ve sitotoksik kapasiteleri sayesinde tamamlayıcı tedavi alanına katkı sağlayabilecek potansiyelde olabilecekleri düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdulgader Ali, S. S. (2017). *The study of isolation and analysis of medicinal potential of Stachys cretica Lamiaceae leaves methanolic extract*. Atılım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aćimović, M., Ljujić, J., Vulić, J., Zheljzkov, V. D., Pezo, L., Varga, A. ve Tumbas Šaponjac, V. (2021). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil from Serbia: chemical composition, classification and biological activity—may it be a suitable new crop for Serbia? *Agronomy*, 11(7), 1282.
- Ahmadi, E., Rezađoost, H. ve Moridi Farimani, M. (2022). Isolation, characterization, and antioxidant activity of neutral carbohydrates from *Astragalus arbusculus* gum. *South African Journal of Botany*, 146, 669–675.
- Akaberı, M., Sahebkar, A., Azizi, N. ve Emami, S. A. (2019). Everlasting flowers: phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Industrial Crops and Products*, 138, 111471.
- Akpınar, R. (2022). *Madımak bitkisindeki fenolik asit ve flavonoidlerin HPLC-DAD yöntemiyle tayini, biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Albayrak, S. ve Kaya, O. (2019). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of endemic *Astragalus argaeus* Boiss. from Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 47(1), 87–97.
- Ayhancı, T. (2019). *Bazı endemik bitkilerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi*. Ege Üniversitesi.
- Azırak, S. (2007). *Thymol ve carvacrol'un in vivo genotoksik etkilerinin araştırılması*. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bashi, D. S., Emami, S. A., Iranshahy, M. ve Asili, J. (2013). Essential oil composition of aerial parts of *Stachys parviflora* L. from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 16(2), 261–264.
- Bellebcir, L., Abidli, N., Nasri, M., Khorchani, T., Mabrouk, M., Zouari, N. ve Hajji, M. (2022). Phytochemical, biological and pharmacological investigation in various extracts from *Astragalus gombo* Coss & Dur L. Ex-Bunge. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 12(1), 94–107.
- Belyurt, S. Ç. (2014). *Gaziantep yöresinde yetişen bazı makromantar türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi*. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bendif, H. (2021). Phytochemical constituents of Lamiaceae family. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(2), 71–88.

- Bener, M. (2009). *Bitki özütleri ve tekstil boyalarındaki flavonoidler için spektrofotometrik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bettaieb Rebey, I., Bourgou, S., Aidi Wannes, W., Hamrouni Selami, I., Saidani Tounsi, M., Marzouk, B., ... Ksouri, R. (2018). Comparative assessment of phytochemical profiles and antioxidant properties of Tunisian and Egyptian anise (*Pimpinella anisum* L.) seeds. *Plant Biosystems*, 152(5), 971–978.
- Bingöl, M. N. (2016). *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *Brachydon* Boiss. bitkisinin antioksidan aktivitesinin değişik in vitro metotlar ile belirlenmesi. Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Chaves, N., Santiago, A. ve Carlos, J. (2020). Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants*, 9(1), 76.
- Çimik, A. (2022). *Helichrysum pamphylicum* Davis & *Kupicha türünün fitokimyasal profil ve biyolojik aktivite yönünden incelenmesi*. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Davis, P. H. (1988). *Flora of Turkey and East Aegen islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Döğler, M. M. (2010). *Ispit'in (Trachystemon orientalis (L.) G. Don) antioksidan aktivitesi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Döner, G. B. (2019). *Yıllara göre diyaliz hastalarında damar endotel disfonksiyonu yapan serbest radikallerin ve antioksidan sistemin incelenmesi*. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dörtkardeş, M. (2019). *Bölgemizde yayılışı bulunan Salvia hasankeyfensis Dirmenci, Celep & O. Guner, Stachys mardinensis (Post) R.R. Mill, Ferulago bernardii L.Tomkovich & M.Pimenov ve Hymenocrater bituminosus Fisch. & C.A.Mey. bitkilerinin antioksidan özel*. Siirt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Emen, S. (2006). *Cyclotrichium niveum bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidant ve DNA'yı serbest radikallerden koruma etkilerinin araştırılması*. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gecibesler, I. H., Behcet, L., Erdogan, M. K. ve Askin, H. (2017). Antioxidant potencies and chemical compositions of essential oils of two endemic species grow in Turkey: *Astragalus oocephalus* subsp. *stachyophorus* and *Astragalus sericans*. *Progress in Nutrition*, 19(6), 60–67.
- Ghaffari, M. A., Chaudhry, B. A., Uzair, M., Imran, M. ve Ashfaq, K. (2021). Total phenolic and flavonoid contents, cytotoxic, immunomodulatory and anti-inflammatory potential of whole plant of *Astragalus creticus* (Fabaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 20(10), 2109–2115.
- Goldansaz, S. M., Mahboubi, A. ve Yazdi-nejad, A. (2017). Investigation on total phenolic content , antibacterial , and antioxidant activity of ethanolic extract of *Helichrysum leucocephalum* Boiss. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 6(1), 20–24.

- Grujičić, D., Stošić, I., Kosanić, M., Stanojković, T., Ranković, B. ve Milošević-Djordjević, O. (2014). Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology*, 66(5), 803–813.
- Güner, A. (2014). *Resimli Türkiye florası*. İstanbul: 1. ANG Vakfı Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M. T. (2012). *A checklist of the flora of Turkey (Vascular Plants)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanical Garden and Flora Research Association Publication, Flora Series 1.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K. H. . (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean islands, Supplement-II*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F. Z. ve Benmansour, A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. rupestre and *Phagnalon saxatile* subsp. saxatile. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 415–422.
- Horo, I., Kocabaş, F., Alankuş-Çalışkan, Ö., Özgökçe, F., Khan, I. A. ve Bedir, E. (2016). Secondary metabolites from *Astragalus lycius* and their cytotoxic activities. *Natural Product Communications*, 11(12), 1847–1850.
- İlhami, G. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715.
- Işık, M. (2012). *Helichrysum plicatum* DC. ve *Phlomis pungens* L. bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin mukayesesi. Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Işık, N. (2020). *Helichrysum pallasii* (Sprengel) Ledeb. bitkisinin in vitro biyolojik aktivite ve biyoaktif kompozisyon analizi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Jahromi, M. A. F., Dehshahri, S. ve Samani, S. F. (2017). Volatile composition, antimicrobial and free radical scavenging activities of essential oil and total extract of *Helichrysum leucocephalum* boiss. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 193–200.
- Jaradat, N., Qneibi, M., Hawash, M., Sawalha, A., Qtaishat, S., Hussein, F. ve Issa, L. (2021). Chemical composition, antioxidant, antiobesity, and antidiabetic effects of *Helichrysum sanguineum* (L.) Kostel. from Palestine. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1), 41–51.
- Kamdem, J. P., Abolaji, A. O., Elekofehinti, O. O., Omotuyi, I. O., Ibrahim, M., Hassan, W., ... Da Rocha, J. B. T. (2016). Therapeutic potential of plant extracts and phytochemicals against brain ischemia-reperfusion injury: a review. *Natural Products Journal*, 6(4), 250–284.
- Karaer, F. ve Kılınç, M. (2001). The flora of Kelkit valley. *Turkish Journal of Botany*, 25(4), 195–238.
- Karaoğlu, E. C. (2019). *Pistacia vera* ekstrelerinin antioksidan özellikleri ile bazı

- kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kaya, O. (2016). *Bazı Astragalus L. taksonlarının fenolik bileşik ve biyoaktivitelerinin karşılaştırmalı incelenmesi*. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Keskin, C. (2009). *Astragalus diphtherites Fenzl var. diphtherites ve Astragalus gymnalocepias Rech (fabaceae) taksonlarının farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan özütlerinin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması*. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Khaled, H. Ben ve Nayeem, N. (2021). Physicochemical characteristics, anti-lipase and antioxidant activities of polysaccharide extracted from *Astragalus spinosis* grown in the northern region of Saudi Arabia. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(43A), 514–526.
- Khan, H. M., Raza, S. M., Anjum, A. A., Ali, M. A. ve Akbar, H. (2019). Antiviral, embryo toxic and cytotoxic activities of *Astragalus membranaceus* root extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(1), 137–142.
- Kherbache, A., Senator, A., Laouicha, S., Al-Zoubi, R. M. ve Bouriche, H. (2020). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench extracts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101826.
- Koçak, M. (2021). *İki endemik Stachys türünün toplam fenolik ve flavonoit içeriği, antioksidan aktivitesi ve tirozinaz enzim inhibisyonunun belirlenmesi*. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Koçak, M. S. (2015). *Üç Stachys taksonunun bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kolaç, T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5(1), 26–42.
- Lakshmi, S., Goudar, G., Singh, M., Dhaliwal, H. S., Sharma, P. ve Longvah, T. (2021). Variability in resistant starch, vitamins, carotenoids, phytochemicals and in-vitro antioxidant properties among diverse pigmented grains. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2774–2789.
- Latresh, M. K. (2017). *The isolation and analysis of medicinal potential of methanolic extract of the Stachys cretica L. flowers*. Atılım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Lekmine, S., Boussekine, S., Kadi, K., Martín-García, A. I., Kheddouma, A., Nagaz, K. ve Bensouici, C. (2020). A comparative study on chemical profile and biological activities of aerial parts (stems, flowers, leaves, pods and seeds) of *Astragalus gombiformis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101668.
- Mari, A., Napolitano, A., Masullo, M., Pizza, C. ve Piacente, S. (2014). Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements. *Journal of*

- Markiewicz-Żukowska, R., Borawska, M. H., Fiedorowicz, A., Naliwajko, S. K., Sawicka, D. ve Car, H. (2013). Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 50.
- McKay, D. L., Chen, C. Y. O., Zampariello, C. A. ve Blumberg, J. B. (2015). Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry*, 168, 233–240.
- Menekşeoğlu, C. (2021). *Tokat bölgesinde yetişen Usnea flipendula ve Evernia prunastri liken örneklerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması*. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nasrollahi, S., Ghoreishi, S. M., Ebrahimabadi, A. H. ve Khoobi, A. (2019). Gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial, antioxidant and anti-cancer activities of essential oils and extracts of *Stachys schtschegleevii* plant as biological macromolecules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 718–723.
- Nayeem, N., Imran, M., Mohammed Basheeruddin Asdaq, S., Imam Rabbani, S., Ali Alanazi, F., Alamri, A. S., ... Alhomrani, M. (2022). Total phenolic, flavonoid contents, and biological activities of stem extracts of *Astragalus spinosus* (Forssk.) Muschl. grown in Northern Border Province, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1277–1282.
- Öztürk, N., Kıyan, H. T., Özkay, Y., Sağlık, B. N. ve Savaroğlu, F. (2016). Evaluation of biological activities of three *Stachys* species from Turkey. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, S164–S165.
- Pandey, A., Sekar, K. C., Tamta, S. ve Rawal, R. S. (2018). Assessment of phytochemicals, antioxidant and antimutagenic activity in micropropagated plants of *Quercus serrata*, a high value tree species of Himalaya. *Plant Biosystems*, 152(5), 929–936.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. ve Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(3), 586–621.
- Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, M. P., ... Dessì, M. A. (2007). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated  $\alpha$ -pyrone–phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 117–126.
- Ruskovska, T., Maksimova, V. ve Milenkovic, D. (2020). Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability - an overview and perspective. *British Journal of Nutrition*, 123(3), 241–254.
- Sadeghi, H., Rostamzadeh, D., Kokhdan, E. P., Asfaram, A., Doustimotlagh, A. H., Hamidi, N. ve Hossein, S. (2022). *Stachys pilifera* Benth: a review of its botany, phytochemistry, therapeutic potential, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7621599.

- Saleem, H., Zengin, G., Khan, K.-U.-R., Ahmad, I., Waqas, M., Mahomoodally, F. M., ... Ahemad, N. (2021). New insights into the phytochemical composition, enzyme inhibition and antioxidant properties of desert cotton (*Aerva javanica* (Bum.f) Shult. -Amaranthaceae). *Natural Product Research*, 35(4), 664–668.
- Samuel, A. O., Huang, B. T., Chen, Y., Guo, F. X., Yang, D. D. ve Jin, J. Q. (2021). Antioxidant and antibacterial insights into the leaves, leaf tea and medicinal roots from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10.
- Sen, A., Kurkcuoglu, M., Bitis, L., Dogan, A. ve Baser, K. H. C. (2019). Chemical composition of endemic *Stachys subnuda* Montbret & Aucher ex Benth. essential oil and its anti-inflammatory and antioxidant activities. *Journal of Essential Oil Research*, 31(4), 326–334.
- Serviddio, G., Bellanti, F. ve Vendemiale, G. (2013). Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 952–968.
- Shahidi, F. ve Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781.
- Shakeri, A., D'Urso, G., Taghizadeh, S. F., Piacente, S., Norouzi, S., Soheili, V., ... Salarbashi, D. (2019). LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS and GC-MS profiling of *Stachys parviflora* L. and evaluation of its biological activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 168, 209–216.
- Shivakumar, A. ve Yogendra Kumar, M. S. (2018). Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(3), 214–236.
- Silinsin, M. (2016). *Inula graveolens* (L.) Desf. bitki türüne ait su ve etanol ekstratlarının antioksidan aktivitelerinin değişik in vitro metotlar ile belirlenmesi. Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Song, Y., Samulski, T. D. ve Van Dyke, T. A. (2008). Cancer. V. T. DeVita, T. S. Lawrence ve S. A. Rosenberg (Ed.), *Cancer* içinde (ss. 3–12). Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins.
- Stegăruş, D. I., Lengyel, E., Apostolescu, G. F., Botoran, O. R. ve Tanase, C. (2021). Phytochemical analysis and biological activity of three *Stachys species* (Lamiaceae) from Romania. *Plants*, 10(12), 2710.
- Susuz, D. (2010). *Civanperçemi türlerinden "Achillea biebersteinii"nin içerdiği flavonoidlerin ekstraksiyonu ve HPLC ile yanyana analizi için yöntem geliştirme ve elyaf boyamadaki davranışlarının incelenmesi*. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P. ve Rahman, H. S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1162.
- Tanrıöver, C. (2019). *Bazı Astragalus türlerinin fitokimyasal içeriklerinin ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerinde antikanser ve antiproliferatif kapasitelerinin araştırılması*. Kilis 7

Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Tunç, U. (2019). *Kazova ve çevresinin (Tokat-Merkez-Pazar-Turhal) florası üzerine bir araştırma*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tuzcu, M. (2000). *Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda serbest radikal reaksiyonlarının lensdeki rolü ve antioksidanlar*. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ulcay, S. ve Şenel, G. (2020). Tokat çevresinde yayılış gösteren bazı tıbbi ve yenilebilir bitkilerin etnobotanik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 8(1), 62–69.
- Wang, J., Jia, J., Song, L., Gong, X., Xu, J., Yang, M. ve Li, M. (2018). Extraction, structure, and pharmacological activities of *Astragalus polysaccharides*. *Applied Sciences*, 9(1), 122.
- Wu, X., Xu, J., Cai, Y., Yang, Y. ve Cao, S. (2021). Cytoprotection against oxidative stress by methylisochlorogenic acid from *Astragalus membranaceus* mainly via the activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Molecules*, 26(13), 3852.
- Yıldız, İ. (2020). *Antioksidan aktiviteye sahip sari kantaron (Hypericum perforatum) flavonoidlerinin anti-enflamatuar ve anti-depresan etkilerinin in vitro ve in silico incelenmesi*. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zanbak, N. K. (2019). *Endemik Astragalus tokatensis Fischer ve Verbascum myrianthum Boiss.'un bazı farmasotik özelliklerinin belirlenmesi*. Tokat Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Tešić, Ž., Stupar, A., Bulut, G., ... Mahomoodally, M. F. (2020). A comparative exploration of the phytochemical profiles and bio-pharmaceutical potential of *Helichrysum stoechas* subsp. barrelieri extracts obtained via five extraction techniques. *Process Biochemistry*, 91, 113–125.
- Zengin, G., Uba, A. I., Ocal, M., Sharifi-Rad, M., Caprioli, G., Angeloni, S., ... Yıldız, E. (2022). Integration of in vitro and in silico approaches to assess three *Astragalus* species from Turkey flora: a novel spotlight from lab bench to functional applications. *Food Bioscience*, 49, 101858.

