

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

***Euphorbia macroclada* (Sütleg en) BİTKİSİNİN ANTiOKSİDAN  
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Oktay ŞAYAK  
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL

VAN-2022



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

***Euphorbia macroclada* (Sütleğen) BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN  
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Oktay ŞAYAK

VAN-2022



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL danışmanlığında, Oktay ŞAYAK tarafından sunulan “*Euphorbia macroclada* (Sütleğen) Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 28/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza:.....

Üye: Doç. Dr. Ahmet ALTAY

İmza:.....

Üye: Dr. Ö. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL

İmza:.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../....../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....  
Enstitü Müdürü



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.

Oktay ŞAYAK





## ÖZET

### ***Euphorbia macroclada* (Sütleğen) BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ŞAYAK, Oktay

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL

Ağustos 2022, 53 sayfa

Bu tez çalışmasında hem antioksidan hem de toksik özelliklere sahip *Euphorbia macroclada* türünün toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin, antioksidan ve antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı. *E. macroclada* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen aseton, etanol ve su ekstralarının toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu ve flavonoid madde içeriği alimünyum klorür kalorimetrik yöntemiyle belirlendi. Ekstrelerin radikal giderme aktivitesi ise DPPH serbest radikalini süpürme, ABTS kation radikalini süpürme ve Fe<sup>+2</sup> metal şelatlama kapasitesi şeklinde kolorimetrik olarak ölçüldü. Deneyler sonucunda bitkinin toplam fenolik madde içeriği çiçeğin su ekstresinde 990 µg GAE /mg iken toplam flavonoid madde içeriği çiçeğin etanol ekstralarında 1138 µg KE/mg olarak bulundu. Bu doğrultuda ABTS radikalini süpürme kapasitesi çiçekten alınan etanol ekstresinde daha yüksek bulundu. DPPH radikalini giderme kapasitesi ise yaprağın su ve etanol ekstralarında 61 µg/g ve 68 µg/g bulundu. ABTS radikalini giderme kapasitesi en yüksek çiçeğin etanol ekstresinde 63 µg/g iken en yüksek DPPH radikalini giderme aktivitesi yaprağın su ekstresinde 61 µg /g bulundu. LC-MS analizleri sonucunda, bitkinin yapısında bol miktarda gallik asit, kafeik asit, kuersetin ve kateşin tespit edildi. Ekstrelerde en çok gallik asit tespit edilmesinin yanı sıra gallik asidin en çok belirdiği ekstre çiçeğin su ekstresi olarak görüldü. Sitotoksiste testi sonucunda, etanol ve su ekstresinin HT-29 hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri arasında fark olmadığı gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan aktivite, *Euphorbia macroclada*, HT-29, Tıbbi ve toksik bitki.



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Euphorbia macroclada* PLANT AND INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS

ŞAYAK, Oktay

M.Sc. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Deniz İRTEM KARTAL

August 2022, 53 pages

In this thesis study, it was aimed to determine the total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antiproliferative activities of *Euphorbia macroclada*, which has both antioxidant and toxic properties. The total phenolic substance content of acetone, ethanol and water extracts obtained from the flower and leaf parts of *E. macroclada* plant was determined by Folin-Ciocalteu and flavonoid substance content by aluminum chloride calorimetric method. The radical removal activity of the extracts was measured colorimetrically as DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical scavenging and Fe<sup>+2</sup> metal chelation capacity. As a result of the experiments, the total phenolic substance content of the plant was 990 µg GAE / mg in the water extract of the flower and the total flavonoid substance content was found as 1138 µg KE/mg in the ethanol extracts of the flower. Accordingly, the capacity to sweep the ABTS radical was higher in ethanol extract from the flower. DPPH radical-removal capacity was 61 µg/g and 68 µg/g in the water and ethanol extracts of the leaf. The ethanol extract with the highest ABTS radical removal capacity was 63 µg/g, while the highest DPPH radical removal activity was 61 µg/g in the leaf's water extract. As a result of LC-MS analyzes, an abundance of gallic acid, caffeic acid, quercetin and catechins were detected in the structure of the plant. In addition to the fact that gallic acid was detected the most in the extracts, the extract in which gallic acid appeared the most was seen as the water extract of the flower. As a result of the cytotoxic test, it was observed that there was no difference between the antiproliferative activities of ethanol and water extract against HT-29 cells.

**Keywords:** Antioxidant activity, *Euphorbia macroclada*, HT-29, Medicinal and toxic plant.



## ÖN SÖZ

Öncelikle bu tez çalışmasının oluşumunda en fazla emeği olan, bana her zaman yol gösteren, yüksek lisans öğrenimim süresince desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL'a canı gönülden minnet ve şükranlarımı sunarım.

Hücre kültürü deneylerimde bana yardımcı olan ve tez savunmamda bilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ahmet ALTAY' a,

Ayrıca tez aşamasında bana her zaman bilgi ve deneyimlerini aktarmaktan kaçınmayan değerli hocam Arş.Gör. Dr. Neşe ERAY VURAN'a,

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitkinin sistematik tayinini gerçekleştiren Arş.Gör. Dr. Hüseyin EROĞLU'na,

LC-MS deneylerimde bana yardımcı olan Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar ekibine,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında vermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı kıymetli arkadaşım Handan DORUK'a,

Hayatımın her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen özveri ile hep yanımda olan değerli aileme ve dostlarıma,

En kalbi duygularla teşekkürlerimi sunarım.

2022

Oktay ŞAYAK



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	5
2.1. Oksidatif stres .....	5
2.1.1. Biyomoleküllerde oksidatif hasar .....	7
2.1.2. Serbest radikaller ilgili fizyolojik ve fizyopatolojik süreçler .....	8
2.2. Antioksidanların Rolü .....	11
2.2.1. Birincil enzimatik sistem .....	11
2.2.2. Enzimatik olmayan sistem.....	12
2.2.3. Onarım sistemi.....	12
2.2.4. Antioksidanların özellikleri .....	13
2.2.5. Antioksidanların etki mekanizmaları.....	13
2.2.6. Fenolik bileşikler .....	13
2.2.7. Karotenoidler .....	15
2.2.8. Antioksidan aktiviteyi değerlendirme yöntemleri .....	16
2.3. Toksik Bitki .....	17
2.3.1. <i>Euphorbia</i> cinsi hakkında genel bilgiler.....	18
2.3.2. <i>Euphorbia macroclada</i> Boiss. ....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler .....	21
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	21
3.1.3. Deney materyali.....	22
3.2. Yöntem .....	22
3.2.1. Ekstraksiyon .....	22
3.2.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları .....	23

	<b>Sayfa</b>
3.2.2.1. DPPH serbest radikal yakalama aktivitelerinin belirlenmesi .....	23
3.2.2.2. ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi .....	24
3.2.2.3. Metal şelatlama etkisi .....	25
3.2.2.4. Toplam fenolik madde içeriği.....	26
3.2.2.5. Toplam flavonoid madde içeriği.....	27
3.2.3. <i>E. macroclada</i> ekstrelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi .....	28
3.2.4. Bitkinin fenolik içeriğinin LC-MS analizleriyle belirlenmesi.....	29
3.2.5. İstatiksel analiz .....	30
4. BULGULAR .....	31
4.1. Verim.....	31
4.2. Antioksidan Aktivitesi Bulguları.....	31
4.2.1. DPPH• radikalini giderme bulguları.....	31
4.2.2. ABTS <sup>+</sup> radikalini giderme bulguları.....	33
4.2.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları .....	34
4.2.4. Toplam fenolik madde miktarı bulguları.....	35
4.2.5. Toplam flavonoid madde miktarı bulguları.....	36
4.3. Bitkinin Fenolik İçeriğinin LC-MS Analiz Bulguları .....	38
4.4. <i>Euphorbia macroclada</i> Türünün Antiproliferatif Aktivite Bulguları.....	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
5.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde İçeriği.....	41
5.2. Antioksidan Kapasite Sonuçları .....	43
5.3. <i>Euphorbia macroclada</i> Türünün Fenolik İçeriğinin LC-MS Analiz Sonuçları ...	44
5.4. <i>Euphorbia macroclada</i> Türünün Antiproliferatif Aktivite Sonuçları .....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZ GEÇMİŞ.....	53

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyolojik sistemlerde üretilen serbest radikaller (Santos-sánchez ve ark., 2019).....	8
Çizelge 2.2. Türkiyenin farklı bölgelerinde tedavi için kullanılan bitkilerin listesi (Altundağ ve Öztürk, 2011; Özbilgin ve Çitoğlu, 2012).....	19
Çizelge 4.1. <i>Euphorbia macroclada</i> ekstratlarının ekstraksiyon verimleri.....	31
Çizelge 4.2. <i>E. macroclada</i> türünün çiçek ve yaprak ekstrelerinin DPPH radikalini giderme aktivitesi .....	33
Çizelge 4.3. <i>E. macroclada</i> türünün çiçek ve yaprak ekstrelerinin ABTS radikalini giderme aktivitesi .....	34
Çizelge 4.4. <i>E. macroclada</i> türünün çiçek ve yaprak ekstrelerinin şelatlama aktivitesi	35
Çizelge 4.5. <i>E. macroclada</i> türünün çiçek ve yaprak ekstrelerinin toplam fenol içeriği	36
Çizelge 4.6. <i>E. macroclada</i> türünün çiçek ve yaprak ekstrelerinin toplam flavonoid içeriği.....	38
Çizelge 4.7. LC-MS analiz sonuçları .....	39



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Süperoksit radikalının reaksiyon mekanizması.....	9
Şekil 2.2. Poliansatüre yağ asitlerinin hidroksil radikali ile reaksiyonu. ....	9
Şekil 2.3. Şeker ile hidroksil radikalının reaksiyonu (Nimse ve Pal, 2015).....	9
Şekil 2.4. A-aminoasitlerin hidroksil radikali ile reaksiyonu (Dean ve ark., 1997).....	10
Şekil 2.5. DNA guanosine bazının hidroksil radikali ile reaksiyonu (Nimse ve Pal, 2015). ....	10
Şekil 2.6. HAT (hidrojen atomu transferi) yapabilen fenolik bileşikler.....	16
Şekil 2.7. SET (tek elektron transferi) yapabilen fenolik bileşikler. ....	16
Şekil 2.8. Çalışma için kullanılan <i>Euphorbia macroclada</i> boiss. fotoğrafı. ....	20
Şekil 3.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi (Cahyana ve ark., 2015).....	24
Şekil 3.2. ABTS radikal giderme aktivitesi (Üstündaş ve ark., 2018). ....	25
Şekil 3.3. Metal şelatlama reaksiyon modellemesi (Fabbrizzi, 2011).....	26
Şekil 3.4. Folin-ciocalteu reaksiyonu (Ford ve ark., 2019).....	27
Şekil 3.5. Kuersetinin $AlCl_3$ ile reaksiyonu (Chang ve ark., 2002).....	27
Şekil 4.1. Kuersetin standart eğrisi. ....	32
Şekil 4.2. Trolox standart eğrisi.....	33
Şekil 4.3. EDTA standart eğrisi.....	35
Şekil 4.4. Gallik asit standart eğrisi.....	36
Şekil 4.5. Kuersetin standart eğrisi. ....	37
Şekil 4.6. Kateşin standart eğrisi. ....	37
Şekil 4.7. <i>E. macroclada</i> türünün su etanol ekstresinin HT-29 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktivitesi.....	39



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
°C	Santigrat
µL	Mikrolitre
Cm	Santimetre
Dk	Dakika
DPPH•	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EC <sub>50</sub>	İnhibisyon konsantrasyonu
G	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
L	Litre
Mg	Miligram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
NaCl	Sodyum klorür
Nm	Nanometre
NO•	Nitrik oksit radikali
O <sub>2</sub>	Oksijen
O <sub>2</sub> •-	Süper oksit radikali
OH•	Hidroksil radikali
ONOO-	Peroksinitrit
ROO•	Peroksit radikali

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>A</b>	Absorbans
<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-Bis(3-Ethilbenzothiazoline-Sülfonik)
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
<b>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>FAO</b>	Gıda ve Tarım Örgütü
<b>GPx</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>HAT</b>	Hidrojen Atom Transferi
<b>LDL</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
<b>MSR</b>	Metiyonin Sülfoksit Redüktaz
<b>NADPH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>RNS</b>	Reaktif Nitrojen Türleri
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RSA</b>	Radikal Süpürme Aktivitesi
<b>SD</b>	Standart Sapma
<b>SET</b>	Tek Elektron Transferi
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>TEAC</b>	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ

Bitkilere olan ilgi ve gereksinim insanlığın varoluşundan itibaren başlamış ve bu bitkilere olan gereksinim artarak süregelmiştir. Arkeolojik çalışmalarda, insanların ilk çağlardan beri bu bitkilerden besinler üretmek, hastalıklara karşı korunmak veya tedavi amacıyla faydalandıkları açıkça görülmektedir. M.Ö. 5000'lerdeki ilk kayıtlara göre bitkilerle tedavi Mezopotamya uygarlığında rastlanmıştır ve bu tedavilerde 250 bitkisel ilacın kullanıldığı tespit edilmiştir (Demirezer, 2010). WHO'nun 2010'daki raporuna göre; tedavi amacıyla veya hastalıklara karşı korunmak için bitkisel ilaçları bitkisel karışımlar veya olduğu gibi ya da belli başlı kısımları kullanılarak, etiketlenmiş ürünler "bitkisel ilaç" olarak adlandırılmaktadır. İnsanlar, bu bitkilerin çeşitli kısımlarının saf halde veya birkaçının homojen karışımı ile yeni bileşikler elde ederek veya bazı çözücülerden yararlanılarak etkin bileşiklerin bitkiden çözüye aktarımı sağlanarak insan ve hayvanlarda görülen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasıyla günümüze kadar bu alternatif yöntemlerin gelmesinde oldukça yarar sağlamıştır (Ersöz, 2010).

Eski çağlardan günümüze kadar tıbbi ve aromatik bitkiler olarak adlandırılan bu bitkiler; alternatif tıp, baharat, sanayi ve kozmetik gibi birden fazla alanda kullanımı devam etmekle beraber bu bitkilere olan ihtiyaç da her geçen gün artmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler eczacılık ve kozmetikte tıbbi ve aromatik amaçlı olarak en eski prosedürleri olan droglardır. Bitkilerin tıbbi özellikleri, belirli kimyasal bileşenlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bitkideki spesifik fizyolojik etkiden sorumlu olan bu kimyasal bileşenler, birçok durumda izole edilmiş, saflaştırılmış ve kesin kimyasal bileşikler olarak tanımlanmıştır. Tıbbi kullanımında olduğu bilinen pek çok bitki araştırılmadan kalmaktadır (Wang ve ark., 2004).

İlaç-kimya sanayindeki değişen ve gelişen olağanüstü gelişmelere rağmen, hala tıbbi bitkilerle alternatif tedavi metotları önemini korumakta, son yıllarda ülkemiz başta olmak üzere gelişmiş birçok ülkede sağlık turizmine olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bununla beraber bazı gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde 2,5 milyara yakın bir nüfusun modern ilaçlara acil olarak ihtiyaç duymalarına rağmen ilaçlara erişimleri yok denecek kadar kısıtlıdır. Birçok araştırmacı doğal olarak yetişen veya yetiştirilen tıbbi bitkilerin kullanımını modern ilaçlara yardımcı olarak geliştirilmelerini

desteklemektedirler. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna (2010) göre günümüzde kullanılan farmasötik ilaçların % 25'i tıbbi bitkilerin işlenmesi ile üretilmektedir. Yine FAO (Gıda ve Tarım Örgütü)' nun 2005' te ki verilerine göre dünya genelinde satılan ilaçların % 30'u bitkilerden elde edilen materyallerinden türetilen bileşikler üretmektedirler. Bitki alemi ilaç, nutrasötik ve tarım kimyası endüstrilerinde çeşitli uygulamalara sahip muazzam miktarlarda terapötik ajanlar kullanılır. Tıbbi ve aromatik bitkiler öncelikle hastalıkları iyileştirmek, önlemek ve sürdürülebilir bir sağlık için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Bu bitkiler gıda, kozmetik gibi alanlarda değerlendirilmesinin yanı sıra güzel koku ve tatları olmasından ötürü de oldukça kullanılmaktadır (Anonim, 2005). Tıbbi bitkilerin terapötik etkilerinden sorumlu aktif ilkeler, alkaloidler, steroidler, flavonoidler, terpenoidler ve tanenler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere genellikle ikincil metabolitler olan fitokimyasallardır (Nonita ve ark., 2010).

Son yıllarda, bitkisel ürünlere yönelik artan talep bitki materyallerinin ülke içinde ve genelinde ticaretini arttırmasıyla beraber bitkilerde daha önce bilinmeyen farmakolojik aktiviteleri olan fitokimyasallar, tıbbi ajan kaynağı olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve kullanılmaktadırlar (Krishnaraju ve ark., 2005). Fitokimyasallar, serbest radikallere karşı koruyucu veya hastalıkları baskılayıcı özelliklere sahip, besin yönünden zengin olmayan bitki kimyasallarıdır. Bitkilerin bu kimyasalları kendilerini korumak için ürettikleri iyi bilinmesine rağmen son araştırmalar, insanları hastalıklara karşı koruyabileceklerini de göstermektedir. İyi bilinen fitokimyasallardan bazıları domateste likopen, soyadaki izoflavonlar ve meyvelerde flavonoidlerdir, ancak bunlar temel besinler değildir ve insan vücudu tarafından hayati bir yaşam kaynağı olarak kabul edilmezler (Wang ve ark., 2004).

Aromatik bitkilerin yapılarında buldukları fenolik bileşikler bitkinin antioksidan aktivitesi olduğunu göstermektedir (Skerget ve ark., 2005). Bu bileşiklerin en çok bulunanları fenolik terpenler, fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Javanmardi ve ark., 2003). Antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşiklerin vücutta oluşan serbest radikalleri temizleme, engelleme ve azaltıcı gibi özellikleri vardır. Fenolik bileşikler biyomoleküllerin serbest radikaller tarafından okside olmalarını engellemektedirler

(Burda ve ark., 2001). Fenolik bileşikler ve flavonoidler en çok bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarında bulunmaktadır (Kähkönen ve ark., 1999).

Son yapılan araştırmalara göre tıbbi bitkiler besinsel özelliği olmayan gıdaların, çeşitli kanser türleri ve kalp-damar bozukluklarına karşı koruyucu bileşikler içerdiklerini göstermiştir. Antiproliferatif ve antikanserojen özelliklere sahip olan bu bileşikler diyet antioksidanlar adı altında toplanabilmektedirler. Bu bileşiklerin koruyucu olmalarındaki en önemli etken serbest radikallere karşı antioksidan aktivite göstermeleridir. Bu antioksidanlardan biri flavonoidlerdir ve sayıları yaklaşık olarak 4000'in üzerinde günlük tüketilen besinlerin çoğunda bol miktarda bulunmaktadır (Kahraman ve ark., 2002).

Bilindiği üzere ülkemiz komşu ülkelerle kıyaslandığında jeolojik, jeomorfolojik ve iklim özelliklerinin yanı sıra farklı fitocoğrafik bölgelerdeki farklı habitat ve gen merkezleri nedeniyle oldukça zengin bir flora sahiptir. Son kayıtlardan aldığımız bilgilere göre Türkiye florasındaki toplam takson sayısı 11 700 civarında ve bunların 3700'ü endemik olma özelliğine sahiptir. Alt tür ve çeşit düzeyindeki taksonlara bakıldığında Türkiye florası, Avrupa'daki tüm ülkelerin florasının toplamına yakın bir sayıya ulaşmakta ve birçok Afrika ülkesi ve Asya'ya göre daha yüksek bir varyasyon oranına sahiptir. Bu çeşitliliğin oluşmasına neden olan faktörler tarihsel olarak buzul çağı dönemine kadar uzanır. Söz konusu dönemde Avrupa florasında büyük kayıplar yaşanırken, Anadolu birçok türe sığınma görevini yerine getirmiştir (Güner ve ark., 2012). Ülkemizin florasına bakıldığında tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı tam olarak bilinmezken, yaklaşık 500 kadar tıbbi bitkinin olduğu varsayılmaktadır (Baytop,

1999). Gelişmiş ülkelerde kullanılan bitkisel ilaçlar katkı maddeleri ve kozmetiklerinde kullanılan birçok bitki ülkemizin florasından çıkmıştır (Bayram ve ark., 2010).



## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

### 2.1. Oksidatif stres

Oksijen, hücre metabolizmasının ve canlılığının korunmasını temsil eden ayrıca paramanyetik özelliklerinden dolayı potansiyel tehlike oluşturabilen elementlerdendir. Bu paramanyetik özellikler yüksek reaktivite ile kısmi oranda oksitlenmiş ara ürünlerin oluşumunu teşvik eden bileşikler reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinmektedir (Davis, 1995). ROS'lar serbest radikaller veya öncü radikallerdir. Elektronlar kararlı nötr moleküllerde maksimum doğal kararlılık olarak bilinen ilgili molekülerin orbitallerinde eşleşir ve bu nedenle, bir yörüngede eşleşmemiş elektronlar varsa oldukça reaktif hale gelebilmesi için herhangi bir molekülden bir elektron yakalama eğiliminde olan türler üretilmektedir. Ana oksijen üçlüsü, serbest radikaldir çünkü iki eşleşmemiş elektronu bulunmaktadır. Üçlü oksijen yapısının reaksiyon hızı biyolojik sistemlerde oldukça yavaştır. Bu üçlü oksijen yapısı hücredeki bileşenlerle reaksiyona girebilen yüksek miktarda reaktif ürünlerle beraber hücrelere zarar vermeye başlarlar. Bu metabolik işlemler biyolojik sistemlerde oldukça tercih edilir çünkü elektron taşıma zincirindeki indirgeme reaksiyonlarında oksijenden suya bir elektronun geçmesiyle serbest radikaller veya ROS'lar oluşmaktadır (Valko ve ark., 2007).

Biyolojik bir sistemdeki serbest radikaller, aşağıdaki gibi eksojen faktörler tarafından üretilebilmektedir. Örneğin; ultraviyole ışınlarının varlığı nedeniyle güneş radyasyonu, ultraviyole radyasyondan dolayı moleküllerdeki bağların homolitik parçalanması vs. Serbest radikaller hastalıklarda aşağıdaki sırayla ortaya çıkar: Örneğin bir kalp krizinde, oksijen ve glikoz tedarik edildiğinde kalp kası askıya alınır ve birçok serbest radikal üretilir vs. serbest radikallerin oluşumuna yardım eden diğer bir eksojen faktör ise kimyasalların canlı organizmalar üzerindeki patolojik etkileridir. Toksik maddelerin daha az toksisiteye sahip maddelere dönüştürülmesi organizmalar için bir gereksinimdir çünkü radikallerin serbest hale gelmelerini teşvik etmektedirler. Birçok ilacın toksisitesi, aslında serbest radikaller veya onların oluşumu üzerindeki etkilerden dolayı oluşmaktadır. Kontaminasyonların ve kirleticilerin varlığı, gıdalardaki katkı

maddeleri, pestisitler vb. birçok etken serbest radikallerin kaynağı olabilmektedir (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

Sistemdeki serbest radikallerin varlığı endojen faktörleri teşvik ettiğinden ötürü enflamatuar süreçler oluşmaktadır. Bu serbest radikaller, bağışıklık sisteminin hücrelerinin içinde bulunan patojenik mikroorganizmaları öldürme işlevine sahiptir. Bu işlemler sırasında serbest radikallerin aşırı oluşumu doku hasarına neden olur. Fagositik hücreler (nötrofiller, monositler veya makrofajlar) süperoksit iyonunu ( $O_2^{\cdot-}$ ) doğrudan üreten NADPH oksidaz sistemini kullanmaktadır.  $O_2^{\cdot-}$  birincil ROS olarak kabul edilir ve diğer moleküllerle enzimatik işlemler yoluyla veya metaller tarafından katalize edilerek ikincil ROS oluşur.  $O_2^{\cdot-}$   $H_2O_2$  ve  $HO_2$  üretmek için protonlanır. Moleküler oksijenin UV ışınlarıyla ışınlanmasından, suyun fotolizinden,  $O_2$ 'nin  $NAD^{\cdot}$  ve  $FpH^{\cdot}$  gibi aerobik hücrelerde oluşan organik radikallere maruz kalmasıyla semikinon radikalleri, katyon radikali piridinyum veya hemoproteinler tarafından  $O_2^{\cdot-}$  üretilir. Aynı şekilde, solunum patlamasının ilk ürünü olan fagositik lökositler  $O_2$  tüketirken radikaller üretilir.  $O_2^{\cdot-}$  polipeptitler, şekerler veya nükleik asitler ile doğrudan reaksiyona girmezler ve yapılarının otoksidasyona maruz bırakılmalarından sonra reaksiyona girmektedirler (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

Bir savunma mekanizması olarak hücreler, nitrik oksit-sentazın etkisiyle hücre içi arginin üzerinde  $NO^{\cdot}$  üretir.  $O_2$ 'nin  $NO^{\cdot}$  ile kombinasyonu lipoproteinlerde lipid peroksidasyonunu indükleyen  $ONOO^{\cdot}$  oluşumu ile sonuçlanır. Bu işlem otoimmün hastalıklarda çok sayıda gerçekleşir. Örneğin; romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, primer biliyer siroz, tip 1 diyabet, çölyak hastalığı, Graves' hastalığı, Hashimoto hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, skleroderma, çoklu skleroz, sedef hastalığı ve vitiligo.

Serbest radikaller, metabolik süreçler boyunca hücre içinde mutlaka mevcuttur, çünkü çoğu kimyasal reaksiyonlar gerekli kimyasal türleri kapsamaktadır. Örneğin, protein oluşturmak için amino asitlerin polimerizasyonu veya polimerizasyon reaksiyonları ya da glikojen oluşturmak için glikozun serbest radikalleri içermesi vs. Serbest radikaller ayrıca aracı metabolizmanın hipoksantin, ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, monoamin oksidaz, siklooksijenaz ve lipoksijenaz gibi çeşitli enzimlerin katalitik aktivasyonunda yer alır. Genel olarak, antioksidan enzimler etkin bir şekilde serbest radikalleri kontrol etmektedirler (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

ROS'un başka bir üretici kaynağı, temel makromoleküllerin (DNA, protein ve lipidler) geri dönüşümsüz kimyasal reaksiyonlarla yapısal değişimlere maruz bırakılmalarıdır. Bu kimyasal reaksiyonlar, malonaldehit ve hidroperoksitler gibi oksidatif hasarı yayan türevler üretir. Ek olarak RNS, nitrik oksit ( $\text{NO}^*$ ), nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2^*$ ) ayrıca peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), nitrosoperoksikarbonat ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), nitronyum iyonları ( $\text{NO}_2^+$ ) ve nötr türler, peroksinitröz asit ( $\text{ONOOH}$ ) ve dinitrojen trioksit ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) gibi türevlerde bulunmaktadır.

Bu türler; hücre regülasyonu ve büyümesi, trombosit agregasyonu, bağışıklık sistem kontrolü, peristalsis, hücresel enerji üretimi gibi normal hücresel süreçler boyunca az miktarlarda üretimleri yapılmaktadır (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

Hücreler için hep zararlı olan ROS'ların bazen canlıların fizyolojileri için faydası da bulunmaktadır. Örneğin; enfeksiyon oluşan noktalarda istilacı patojenleri yok etme yeteneğine sahiptirler (Halliell, 1996; Valko ve ark., 2007)

Çizelge 2.1' de aerobik biyolojik sistemlerde enerji üretim süreci boyunca mevcut olan temsili serbest radikalleri göstermektedir.

### 2.1.1. Biyomoleküllerde oksidatif hasar

Biyolojik oksidanlar gibi davranan birçok ROS vardır, ancak  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en büyüğüdür. Oksidan; basit bir proton eklenmesiyle çok aktif oksitleyici ajan olan  $\text{HO}_2^*$  oluşumuna yol açar.

Serbest radikaller, metabolizma üzerinde çeşitli reaksiyonlar gerçekleştirir ve bu reaksiyonlar hücre hasarının kaynağı olabilir (Nakamura ve ark., 1997):

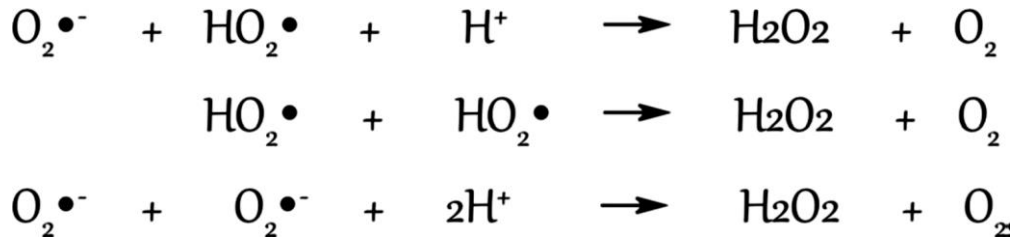
1. Membranların çoklu doymamış lipidlerinde, akışkanlık kaybı ve hücre lizisi nedeniyle lipid peroksidasyonunun oluşumu (Şekil 2.2).
2. Glikozitlerde, hücre fonksiyonlarının değişmesiyle interlökinlerin aktivitesi ve prostaglandinlerin, hormonların ve nörotransmitterler ile ilişkili olan reaksiyonlar (Şekil 2.3) (Nimse ve Pal, 2015).
3. Proteinlerde, denatürasyon ve inaktivasyon üretimi (Şekil 2.4) (Dean ve ark., 1997).
4. Nükleik asitlerde, bazların değişmesi (Şekil 2.5) (Nimse ve Pal, 2015), mutajenez üretimi ve karsinogenez.

Çizelge 1.1. Biyolojik sistemlerde üretilen serbest radikaller (Santos-Sánchez ve ark., 2019)

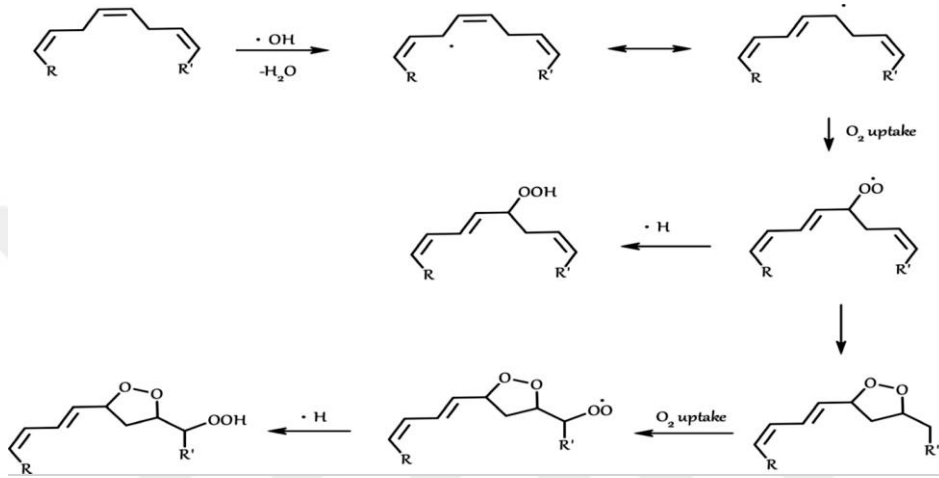
Tür	Kaynak	Fonksiyon
$O_2^{\cdot-}$	Enzimatik işlemler, otooksidasyon reaksiyonu ve enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonları	Askorbik asit ve $\alpha$ -tokoferol sitokrom-c oksitlemek için veya demir komplekslerinin indirgeyici oksitleyici ajan olarak işlev görebilir.
$HO_2^{\cdot}$	$O_2^{\cdot-}$ protonasyonu	$HO_2^{\cdot}$ yağ asidi peroksidasyonunu başlatır.
$HO^{\cdot}$	$H_2O_2$ , metal katalizörlü Fenton reaksiyonu yoluyla $HO^{\cdot}$ üretir.	$HO^{\cdot}$ DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere hem organik hem de inorganik moleküllerle reaksiyona girer.
$NO^{\cdot}$	Bir substrat olarak arginin ve bir elektron kaynağı olarak NADPH kullanılarak nitrik oksit-sentazın etkisi	$NO^{\cdot}$ hücre içi ikinci bir habercidir ve guanilat siklaz ve protein kinazlarını uyarır ve kan damarlarında düz kas gevşemesine yardımcı olur.
$NO_2^{\cdot}$	$ONOO^-$ protonlanması veya $ONOOCO_2^-$ homolitik parçalanması	Bu radikal, plazmadaki askorbat ve $\alpha$ -tokoferolü azaltan antioksidatif mekanizmaya etki eder.
$ONOO^{\cdot}$	$O_2$ 'nin $NO^{\cdot}$ ile reaksiyonu	$ONOO^{\cdot}$ proteinlerdeki metiyonin ve tirozin kalıntılarının güçlü bir oksitleyici ve nitrasyon türüdür ve nitroguanin oluşturmak için DNA'yı oksitler.
$CO_3^{\cdot-}$	Reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) $Cu_2^+ + OH^-$ ara maddesi, $CO_3^{\cdot-}$ üretmek için bikarbonat ile reaksiyona girer	$CO_3^{\cdot-}$ proteinler ve nükleik asitler gibi biyomolekülleri oksitler.
$ONOOCO_2^-$	Peroksinit $CO_2^-$ eklenerek, $ONOO^-$ 'nin $CO_2$ ile reaksiyonu ile elde edilir.	Bu anion, oksihemoglobinin tirozin fragmanlarının serbest radikal yoluyla nitrasyonunu teşvik eder.

### 2.1.2. Serbest radikaller ilgili fizyolojik ve fizyopatolojik süreçler

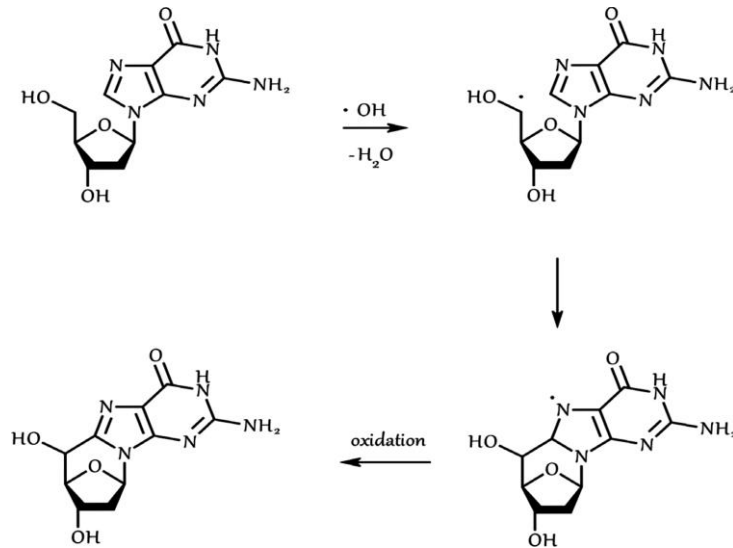
İnsan vücudu oksidatif strese antioksidan savunma ile yanıt verir, ancak bazı durumlarda yetersiz kalabilir, farklı süreçler fizyolojik ve fizyopatolojik durumları tetikleyebilir. Halihazırda, serbest radikallerin üretimi ilgili birçok süreç tanımlanmıştır. Bunlar arasında mutajenez, hücre transformasyonu, kanser, arterioskleroz, miyokard enfarktüsü, diyabet, inflamatuvar hastalıklar, merkezi sinir sistemi bozuklukları ve hücre yaşlanması (Rice-Evans, 1995; Halliwell, 1996).



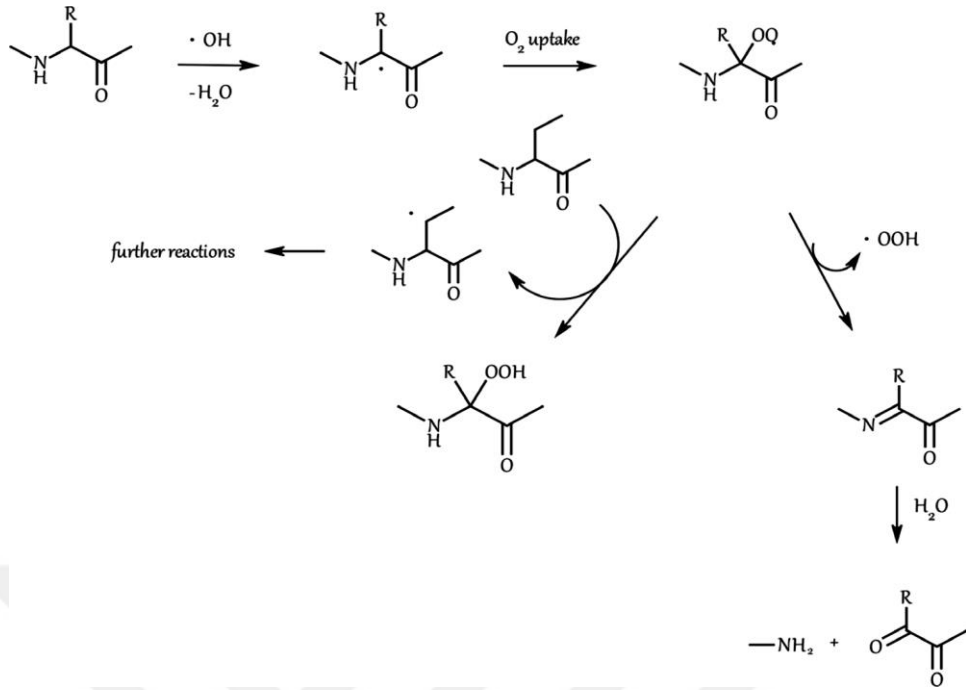
Şekil 2.1. Süperoksit radikalinin reaksiyon mekanizması.



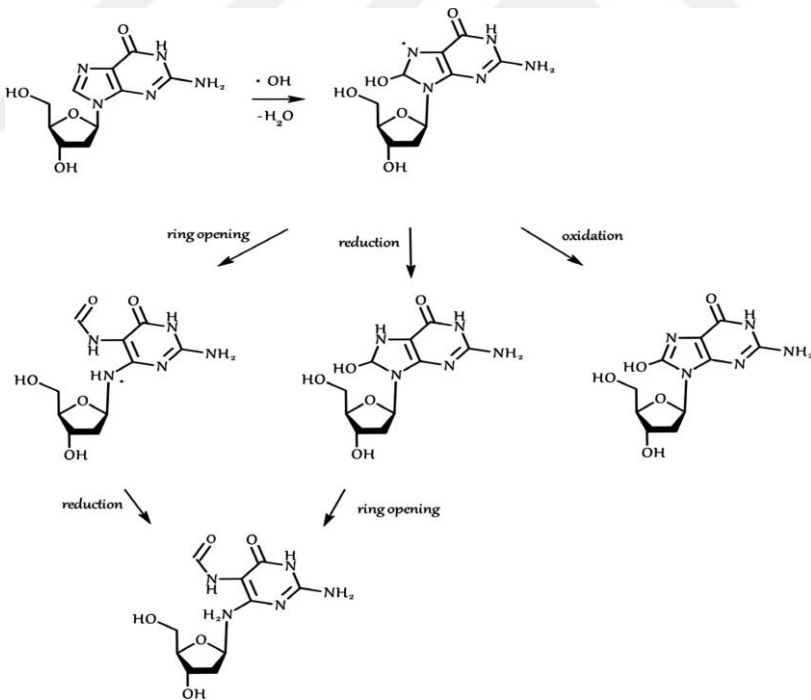
Şekil 2.2. Poliansatüre yağ asitlerinin hidroksil radikali ile reaksiyonu.



Şekil 2.3. Şeker ile hidroksil radikalinin reaksiyonu (Nimse ve Pal, 2015).



Şekil 2.4.  $\alpha$ -aminoasitlerin hidrosil radikali ile reaksiyonu (Dean ve ark., 1997).



Şekil 2.5. DNA guanosine bazının hidrosil radikali ile reaksiyonu (Nimse ve Pal, 2015).

## 2.2. Antioksidanların Rolü

Oksijenli ortamlardaki biyolojik sistemler hem fizyolojik hem de biyokimyasal savunma mekanizmalarını geliştirmiştir. Bunlar arasında fizyolojik düzeyde, içindeki O<sub>2</sub> seviyelerini koruma işlevine sahip bir mikrovasküler sistem vardır. Biyokimyasal düzeyde ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma moleküllerini onarmak için kullanılan bir sistem bulunmaktadır (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

### 2.2.1. Birincil enzimatik sistem

Aerobik organizmalar bazı antioksidan enzimler geliştirmiştir. Örneğin; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR). SOD, O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dismutasyon reaksiyonundan sorumludur. Katalaz veya GPx tarafından katalize edilen reaksiyonlar H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüştürülür. SOD hücredeki en önemli ve en güçlü detoksifikasyon enzimidir. SOD bir metalloenzimdir ve bu nedenle aktivitesi için kofaktör olarak bir metal gerektirir. SOD tarafından kofaktör olarak gerekli olan metal iyonunun tipine bağlı olarak farklı enzim formları bulunmaktadır. (Fridovich, 1995; Dringen ve ark., 2005). CAT, kofaktör olarak demir veya manganez kullanır ve katalize eder. Su ve moleküler oksijen üretmek için hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bozunması veya indirgenmesi gerekir ve böylece SOD tarafından başlatılan detoksifikasyon süreci tamamlanır. CAT, bir ortamda saniye de milyonlarca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünü ortamdaki uzaklaştırmada aşırı verimlidir (Chelikani ve ark., 2004; Santos-Sánchez ve ark., 2019).

CAT enziminin ana işlevi yağ asitlerinin oksidasyona maruz bırakıldıktan sonra açığa çıkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizlemektir ve katalaz biyolojik sistemlerde peroksidomlarda bulunmaktadır. GPx ise önemli bir hücre içi enzim, sudaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i ve lipid peroksit alkollerini parçalayan bu işlemlerini mitokondride ya da sitozol de gerçekleştirmektedir. (Góth ve ark., 2004). GPx enziminin reaksiyon üzerindeki etkisi selenyum elementine bağlıdır. İnsanlarda GPx'in hücresel sistemlerde GPx1–GPx8 olmak üzere sekiz enzimi bulunmaktadır (Morón ve Castilla-Cortázar, 2012). Bu sekiz enzim arasında GPx1, en çok selenoperoksidazdır ve tüm hücrelerde bulunur. GPx lipid peroksidasyonunu baskılayan ve bu nedenle hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan en önemli

enzimlerdenir (Gill ve Tuteja, 2010). Düşük GPx aktivitesi oksidatif hasara, hücre zarının fonksiyonel proteinlerinin ve yağ asitlerinin zarar görmesine yol açar. GPx enzimlerinden ve özellikle GPx1, birçok hastalığın geliştirilmesinde ve önlenmesinde rol oynamıştır. Örneğin; kanser ve kardiyovasküler hastalıklar. Bu enzimlerin üretimi hücrelerde DNA tarafından düzenlenmektedir (Rayman, 2005).

### **2.2.2. Enzimatik olmayan sistem**

Bu antioksidan sistemi, serbest radikalleri yakalayan antioksidanlardan oluşmaktadır. Serbest radikalleri önlemek için öncelikle radikal başlatma reaksiyonunu önlemek gerekir. Radikalleri nötralize etmek veya onları yakalamak için elektronlarını verirler ve bu süreç sırasında antioksidanlar serbest radikaller haline gelir, ancak ilk serbest radikallerden daha az reaktiftirler. Serbest radikaller bir grup antioksidanlar tarafından kolayca nötralize edilir. Bu antioksidanlar bir dizi antioksidan bileşikler veya serbest radikal süpürücüler olabilmektedir. Örneğin; E vitamini, C vitamini, karotenler, ferritin, seruloplazmin, selenyum, indirgenmiş glutatyon (GSH), manganez, ubikinon, çinko, flavonoidler, koenzim Q, melatonin, bilirubin, taurin ve sistein. Belirli gıdalardan ekstrakte edilen flavonoidler, reaktif türler üretmek için kararlı kompleksler veya daha az reaktiviteye sahip komplekslerle doğrudan etkileşime girerler. Diğer gıdalarda ise flavonoidler bazı enzimlerin katalitik etkisinde ortak substrat işlevini yerine getirmektedir (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

### **2.2.3. Onarım sistemi**

ROS tarafından zarar görmüş biyomolekülleri onaran veya ortadan kaldıran enzimler, lipitler, proteinler ve DNA gibi onarım sistemlerini oluşturur. Yaygın örnekler, DNA onarım enzim sistemlerini (polimerazlar, glikosilazlar ve nükleazlar) ve proteolitik enzimler (proteinazlar, proteazlar ve peptidazlar) memeli hücrelerinin hem sitozolünde hem de mitokondrilerinde bulunurlar. Spesifik örneklerden bazıları GPx, glutatyon redüktaz (GR) ve (MSR) metiyonin sülfoksit redüktazdır. Aşırı ROS saldırısının neden olduğu oksidatif hasara karşı bu enzimler onarım sürecinde araçlar olarak hareket etmektedirler (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

#### **2.2.4. Antioksidanların özellikleri**

Bir bileşik veya antioksidan sistemin temel özelliği, bir oksidatif yayılma zincirinin saptanması, üretilen radikalın stabilize edilmesi sağlanır ve böylece insan vücudundaki oksidatif hasarı azaltmaya yardımcı olur (Namiki, 1990). Birincil (zincir reaksiyonunu kırma, serbest radikal süpürücüler) ve ikincil veya önleyici olmak üzere iki temel antioksidan türü mevcuttur. İkincil antioksidan mekanizmalar lipid hidroperoksitlerin inhibisyonunu, metallerin deaktivasyonunu içerir ve istenmeyen uçucuların üretimini kesintiye uğratarak, birincil antioksidanların rejenerasyonu ve singlet oksijenin ortadan kaldırılması sağlamaktadırlar. Bu nedenle antioksidanlar "Düşük miktarlarda, engelleyici etki gösteren maddeler" olarak tanımlanabilmektedir (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

#### **2.2.5. Antioksidanların etki mekanizmaları**

In vitro radikalleri azaltan bir bileşik bir in vivo sistemde antioksidan gibi davranamayabilir. Bunun nedeni, serbest radikallerin kolayca yayılması ve difüze olmasıdır. Nanosaniye mertebesinde son derece kısa ömürleri vardır, bu nedenle antioksidanlar, oksidatif hasarın olduğu yer ve zamanda hazır olmalıdırlar. Buna ek olarak, reaksiyonlar ikinci dereceden reaksiyonlardır. Bu nedenle, antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki ilişki sadece antioksidanların ve serbest radikallerin konsantrasyonuna bağlı değildir, aynı zamanda hem reaktiflerin kimyasal yapısı, hem ortam hem de reaksiyon koşulları ile ilgili faktörlere de bağlıdır (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

#### **2.2.6. Fenolik bileşikler**

Fenolik bileşikler, çeşitli kimyasal yapıları kapsayan ve farklı biyolojik aktivitelerle insan ve hayvan beslenmesinin önemli bir parçası olan 8000 farklı bileşiklerle geniş bir kimyasal madde grubunu oluşturmaktadır (Martínez Valverde ve ark., 2000). Fenolik bileşikler, bitkilerin savunmasında ve sinyal verme mekanizmasında

önemli bileşenlerdir. Bu bileşikler, patojenik organizmalar ve yırtıcıların neden olduğu stresle mücadele eder. Bu bileşiklerin bitkilerdeki işlevi çeşitlidir.

Daha büyük karmaşık bileşiklerin öncüleri olarak veya bitki büyümesinin düzenlenmesi ve kontrol süreçlerinde olduğu kadar bitkilerin savunma sistemlerinde de bulunmaktadır. Fenolik bileşikler, hidrojen donörleri olarak hareket etme veya demir ve bakır gibi metal iyonlarını şelatlama, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu engelleme gibi özelliklere sahip bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerdeki bu özellikler kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar (Paran ve ark., 2009), gastrointestinal (Yoshida ve ark., 1990), kolon (Ranelletti ve ark., 1992), meme ve yumurtalık kanserleri (Scambia ve ark., 1990) ve lösemi (Teofili ve ark., 1992; Yoshida ve ark., 1992; Ren ve ark., 2001) gibi rahatsızlıkların risklerinin azalması ile bağlantılıdır. Fenolik bileşikler ayrıca vazorelaksasyona ve anti-alerjenik aktiviteye (Sakakibara ve ark., 2003) de sahiptir. Fenolik bileşikler, *in vitro* LDL'nin oksidasyonunu inhibe eder (Riemersma ve ark., 2001). Fenolik bileşikler, hidroksil grubundan bir hidrojen transferiyle serbest radikalleri azaltır veya engeller. Bir fenolik bileşiğin reaksiyon mekanizması bir peroksil radikali (ROO<sup>\*</sup>) ile hidrojen katyonunun uyumlu transferini içerir ve fenolden radikale, biriyle bir H-O bağının elektron geçiş durumunu oluşturur. Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi, reaksiyon ortamına fenolik bileşiklerle hidrojen bağlarının oluşumuna bir çözücü eklendiğinde güçlü bir şekilde azalır. Örneğin, fenol ve peroksil radikali arasındaki reaksiyon hızı üzerinde alkollerin çift etkisi vardır. Bir taraftan, alkoller hidrojen bağlarının alıcıları olarak öte yandan elektron transferi yoluyla peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen fenollerin anyon fenoksitlere iyonlaşma işlevini görmektedir. Çözücülerin fenolik bileşiklerle antioksidan aktivite üzerindeki genel etkisi büyük bir ölçüde son bileşiklerin iyonizasyon derecesine (Foti, 2007), bir OH bağlarının ve adyabatiklerin ayrışma enerjisini belirlemek için teorik çalışmaya, çeşitli yapı ve polariteye sahip fenolik bileşiklerin iyonlaşma potansiyellerine bağlıdır. Bunların arasında tirozol, hidroksitirosol ve gallik ve kafeik asitler bulunmaktadır (Leopoldini ve ark., 2004).

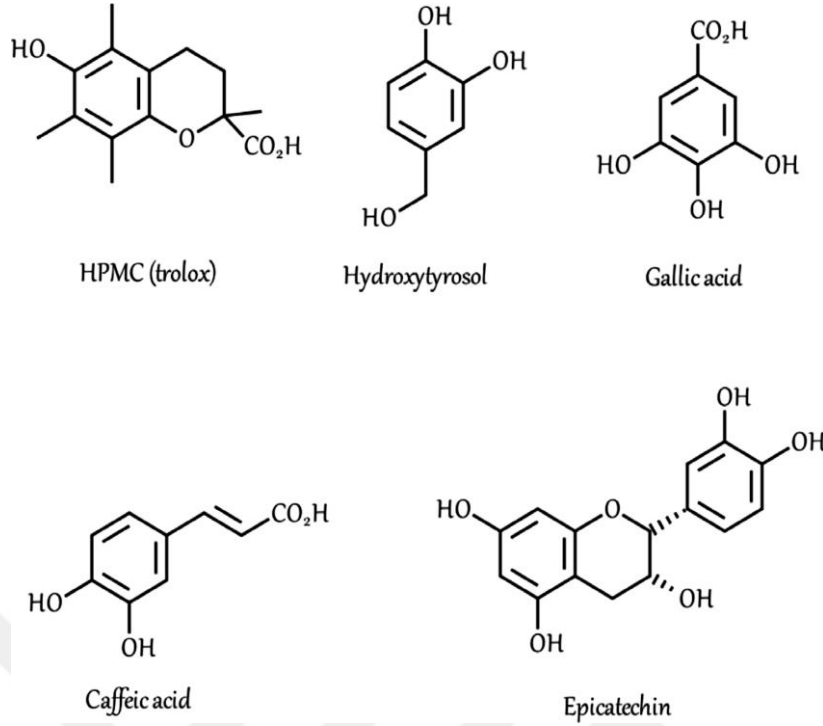
Flavonoidler, bilinen 8000'den fazla ayrı bileşik ile çok çeşitli vasküler bitkilerden izole edilen fenolik maddelerdir. Bitkilerde antioksidanlar, antimikrobiyaller, fotoreseptörler, görsel çekiciler, yem kovucular olarak hareket ederler. Birçok çalışma, flavonoidlerin antialerjenik, antiviral, antiinflamatuvar ve vazodilatör etkiler dahil olmak

üzere biyolojik aktiviteler sergilediğini ileri sürmüştür. Bununla birlikte en çok ilgi, serbest radikal oluşumunu azaltma ve serbest radikalleri temizleme yeteneklerinden dolayı flavonoidlerin antioksidan aktivitesine ayrılmıştır. Flavonoidlerin in vitro olarak antioksidan olarak hareket etme kapasitesi geçmiş yıllarda birçok çalışmaya konu olmuş ve antioksidan aktivitenin önemli yapı-aktivite ilişkileri kurulmuştur. Alınan flavonoidlerin çoğu, bazıları hala radikal süpürücü bir yeteneğe sahip olan çeşitli fenolik asitlere geniş ölçüde parçalanır. Hem emilen flavonoidler hem de metabolitleri, plazma antioksidan statüsünün artması, eritrosit zarlarının ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin E vitamini üzerindeki koruyucu etkisi ve eritrosit zarı çoklu doymamışlığının korunması ile deneysel olarak kanıtlanan bir in vivo antioksidan aktivite göstermektedir (Pietta, 2000).

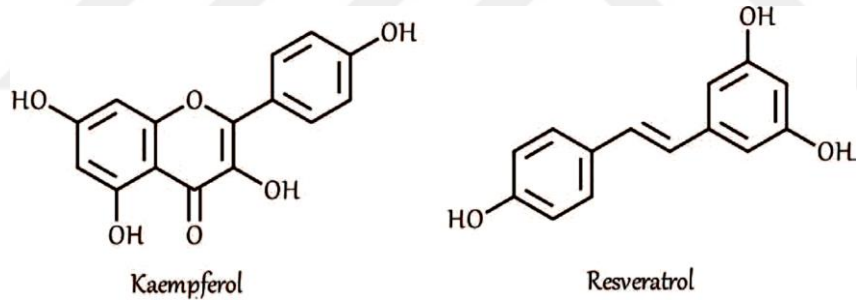
### **2.2.7. Karotenoidler**

Tüm bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda 700'den fazla karotenoid tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Britton ve ark., 2004). Çoğu karotenoidler karakteristik simetrik bir tetraterpen iskeletine sahiptir. Doğrusal hidrokarbon iskeleti 40 karbondan oluşur ve çeşitli yapısal değişikliklere duyarlıdır. Bu yapısal özellikler hidrojenasyon derecesi, cis-trans izomerizasyonu, lineer iskeletin bir veya her iki ucunda döngülerin varlığı veya yan grupların (genellikle oksijen içeren) eklenmesi sonraki glikosilasyon ile bağlantılıdır. En karmaşık zincir değişiklikleri kısalması veya karotenoidler oluşturmak için ortaya çıkan 50 karbonlu tetraterpen iskeletinin uzaması ile ilgilidir. İki birim farnezilin yoğunlaşmasından 30 karbonlu tetraterpen iskeletli karotenoidler bulmak da mümkündür. Bu bileşikler, biyolojik sistemlere pigmentasyon kazandırmanın yanı sıra, diğer önemli fonksiyonları da tamamlamaktadır (Landrum, 2010).

Karotenoidler, peroksil radikali süpürücüleri olarak tanımlanmıştır. Karotenoidlerin yapısını oluşturan çoklu doymamış zincirler lipofilik bir özelliğe sahiptir. Bu özellik lipoproteinlerin ve hücre zarlarının ve peroksil radikallerine karşı savunma sağlamaktadır.



Şekil 2.6. HAT (hidrojen atomu transferi) yapabilen fenolik bileşikler.



Şekil 2.7. SET (tek elektron transferi) yapabilen fenolik bileşikler.

### 2.2.8. Antioksidan aktiviteyi değerlendirme yöntemleri

Bir bileşiğin antioksidan aktivitesi, in vitro veya in vivo olarak değerlendirilebilir. Basit deneyler yoluyla ve aynı zamanda prooksidan etki olası farklı moleküller üzerinde değerlendirilir. Antioksidan aktivite doğrudan ölçülemez ama antioksidanın etkileri oksidasyon derecesi kontrol edilerek belirlenebilmektedir. Antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için çeşitli yöntemler vardır. Bazı yöntemler, farklı bir oksidasyon adımını ve ardından oluşan yanıtın ölçümünü içerir. Aktiviteyi değerlendirmek için kullanılan yöntemle bağlı olarak yanıtlar da değişmektedir. Bir numunenin antioksidan

aktivitesi incelenirken, ROS kaynağının yanı sıra hedef substrat da dikkate alınmalıdır. Bir antioksidan, lipidleri oksidatif hasara karşı koruyabilirken diğer yandan diğer biyolojik molekülleri oksidasyona teşvik edebilmektedir (Arouma, 1996). Antioksidan aktivite deneylerinin çoğu, bir promotörün varlığı ve test sisteminde bir veya daha fazla değişkenin kontrol edilmesi hızlandırılmış oksidasyonu indüklemeyi içermektedir. Örneğin; sıcaklık, antioksidan konsantrasyonu, pH vb. Ancak oksidasyon mekanizmaları, bu değişkenlerin bazıları üzerinde değişiklik yapıldığında değişebilir. Bu nedenle, yapıldığı aralıkların değerlendirilmesi önemlidir. Kantitatif ölçüm antioksidan aktivitenin güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için yapılmaktadır (Santos-Sánchez ve ark., 2019).

### **2.3. Toksik Bitki**

Şifalı bitkiler özü, saf bileşik veya türevi olarak, yeni ilaçların keşfi için sınırsız fırsatlar sunmaktadır. İnsani ve hayvansal ilaçlarda kullanılan doğal ürünlerin çoğu biyolojik aktiviteleriyle ilgili sağlam bilimsel kanıtlara sahiptir. Bununla birlikte, tıbbi bitkilerin tüketicilerde neden olabileceği olası toksisite hakkında çok az bilgi veya kanıt bulunmaktadır (Dias ve Takahashi, 1994). İlaç keşfi ve geliştirilmesi ile ilgili olarak sağlık otoriteleri, ilaç endüstrisi ve hastalar gibi ilgili tüm grupların dikkate alınması gereken farklı ağırlıkları vardır (Olejniczak ve ark., 2001). İnsanlar tarafından uzun süreli kullanımlarına dayanarak, geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin düşük toksisiteye sahip olması beklenebilir. Bununla birlikte, son araştırmalar geleneksel tıpta uygulanan birçok şifalı bitkinin yan etkiler gösterdiğini göstermiştir (Ertekin ve ark., 2005; Koduru ve ark., 2006). Bu nedenle, herhangi bir bitkinin tıbbi amaçlar için geleneksel kullanımının hiçbir şekilde bu bitkinin güvenliğini garanti etmediği vurgulanmalıdır. Bu, bu tür şifalı bitkilerin kısa süreli ve uzun süreli kullanımından kaynaklanan potansiyel toksik etkiler hakkında endişe uyandırmaktadır. Tıbbi bitkiler veya bunlardan türetilen müstahzarlar (önceden hazırlanmış ve eczanede bulunan ilaç) üzerindeki akut ve subkronik toksisite çalışmalarının verileri, özellikle farmasötiklerin geliştirilmesinde kullanım için insanlarda güvenliklerine olan güveni artırmak için elde edilmelidir (Ukwuani ve ark., 2012). Bu nedenle, hayvanlarda veya insanlarda kullanılması amaçlanan herhangi bir tıbbi bitki ekstraktının potansiyel toksik etkilerinin değerlendirilmesi mutlaka önceden yapılmalıdır (Yuet Ping ve ark., 2013).

### 2.3.1. *Euphorbia* cinsi hakkında genel bilgiler

Euphorbiaceae ailesi dördüncü en büyük aile olarak kabul edilir. 300'den fazla cins ve yaklaşık 7500 tür içeren anjiyospermiler grubu tropikal Afrika'da yaygın olarak yayılmıştır. Euphorbiaceae bitkileri ağaçlar, çalılar, otlar veya nadiren lianas altında yetişmektedir (Pandey, 2006). Yaprakları sarmal ya da dekussat dizilişli, bazı türlerde diken halinde çoğunlukla dallanmış ve ekseriye beyaz renkli süt salgısı ihtiva etmektedirler (Rebman ve Simpson, 2006).

Kapalı tohumlu bitkilerin en büyük ve en önde gelen familyalarından biri olan Euphorbiaceae, küçük otsu bitkilerden ağaçlara kadar değişen büyüme formları gösterir. Yaklaşık 2000 tür ile temsil edilen *Euphorbia* cinsi, geniş tolerans ve adaptasyona sahip en büyük cinslerden biridir (Webster, 1994). Hepsi benzersiz çiçek yapıları ve lateks içerir. Bu bitkilerde ikincil metabolitler olarak bulunan bileşikler flavonoidler, fenolik bileşikler ve terpenoidler varlığı nedeniyle tedavi edici özelliklere sahiptir (Özbilgin ve Çitoğlu, 2012). *Euphorbia* cinsi, çok çeşitli izoprenoidleri mono-, sesqui- ve diterpenlerden triterpenoidlere kadar değişen bileşenler ve steroidler içermektedir. *Euphorbia* diterpenleri, yapıları ve tedavi edici önemi gibi çeşitli özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Özbilgin ve Çitoğlu, 2012). *Euphorbia* türlerinde izole edilen bu bileşenler ve özleri, antiproliferatif, antitümör, antimikrobiyal, antiviral ve antiinflamatuvar, sitotoksik ve antioksidan aktiviteler dahil olmak üzere birçok farklı biyolojik aktivite gerçekleştirmektedirler (Özcan ve Özcan, 2004; Shi ve ark., 2008).

Özellikle, diterpenoidler hem yapısal çeşitlilikleri hem de terapötik özellikleri ve taksonomik markörleri nedeniyle çalışmalar listesinin en başında yer alır. İçerdiği çok çeşitli kimyasal bileşikler nedeniyle dünya çapında birçok ülkede geleneksel ve halk arasında tıbbi olarak kullanılan sütleğen türleri ülkemizde migren, bel soğukluğu ve siğillerin yanı sıra çeşitli cilt hastalıkları ve yaralarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla bitki tohumları, kökleri, ağaç kabuğu, yapraklar ve lateks sıklıkla kullanılmaktadır. Lateks reçine, kauçuk, nişasta (amylum), siyanit ve çeşitli enzimler içerir. Halk hekimliği olarak kullanılmalarının yanı sıra, böcekleri ve otçulları kovan ve ciltte iltihaplanmaya neden olan toksik özelliklere sahip oldukları da tespit edilmiştir (Barla ve ark., 2007). *Euphorbia* türleri, yaygın olarak dağılmış bitkilerdir ve izoprenoid bileşenlerinin kimyasal çeşitliliğiyle, özellikle farklı çekirdek çerçeveler ve çeşitli aktivitelere sahip

diterpenoidler ile ünlüdür. *Euphorbia* cinsindeki bitkilerin çoğu halk hekimliğinde kullanılmaktadır ancak bunlar sadece terapötik açıdan değil aynı zamanda toksisite de sergilemektedir. Çalışmalar, diterpenoidlerin özellikle tiglian, ingenan ve abietan iskeletlere sahip olanların en çok toksisite ve önemli biyolojik aktivitelerle ilgili olduğunu ileri sürmüştür (Shi ve ark., 2008).

Çizelge 2.2. Türkiye'nin farklı bölgelerinde tedavi için kullanılan bitkilerin listesi (Altundağ ve Ozturk, 2011; Özbilgin ve Çitoğlu, 2012)

Tür isimleri	Terapötik kullanımları
<i>E. virgata</i> Waldst. & Kit.	Ekzema
<i>E. stricta</i> L.	Diş ağrısı için ateş düşürücü, nasır
<i>E. coniosperma</i> Boiss.	Yara iyileştirici
<i>E. seguieriana</i> Necker	Anti-inflamatuvar, yara iyileştirici, sıtma için ateş düşürücü
<i>E. rigida</i> Bieb.	Anti-hemoroidal, anthelmintik
<i>E. heteradena</i> Jaub. & Spach.	Kabızlık
<i>E. apios</i> L.	İshal edici
<i>E. falcata</i> L. supsp. <i>falcata</i> var. <i>Falcate</i>	Mantar enfeksiyonu, ekzema
<i>E. armena</i> Prokh.	Kabızlık, yara iyileştirici
<i>E. nicaeensis</i> All. subsp. <i>lasiocarpa</i> Boiss.	Antifungal, anthelmintik
<i>E. macroclada</i> Boiss.	Yara iyileştirici, ekzema, anti-hemoroidal, diş ağrısı için ateş düşürücü, mantar enfeksiyonu, sıtma için ateş düşürücü
<i>Euphorbia</i> sp.	Kabızlık
<i>E. myrsinites</i> L.	Anthelmintik

### 2.3.2. *Euphorbia macroclada* Boiss.

*Euphorbia macroclada* Boiss. *Euphorbia* cinsinin bir türüdür ve İran, Türkiye, Ermenistan, Gürcistan, Azerbaycan, Irak, Suriye, Lübnan ve Filistin gibi kurak ve yarı kurak kara ülkelerinde yetişir. Türkiye'de *E. macroclada* Boiss Ağrı, Bitlis, Erzurum, Gümüşhane vb. bazı illerde yetişmektedir (Özcan ve Özcan, 2004).

*Euphorbia macroclada* Boiss'in sınıflandırılması;

Alem: Plantae (Bitkiler)

Şube: Trakeobionta (Damarlı)

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı tohumlu)

Sınıf: Magnoliopsida

Alt sınıf: Rosidae (Gülgiller)

Takım: Euphorbiales

Aile: Euphorbiaceae

Cins: *Euphorbia* L. (Spurge)

Tür: *Euphorbia macroclada* Boiss.



Şekil 8. Çalışma için kullanılan *Euphorbia macroclada* Boiss. fotoğrafı.

A) Bitkinin doğal ortam hali, B) Bitkinin kurutulmuş hali

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Antioksidan aktivite ve fenolik içerik tayininde kullanılan cihazlar ve sarflar; Mikro pipet; 1000, 200, 100, 10, 2.5 µL (Eppendorf), Hassas terazi (Radway, Poland), Manyetik Karıştırıcı (Velp), Evaporatör (Heidolp), LC-MS (DIONEX UltiMate 3000), Liyofilizatör (Azbil Telstar Technologies LYOQUEST-85), Santrifüj (Isolab 5810 R), Ultrasonik Banyo (Isolab), ELISA plaka okuyucusu (Multiskan™ GO- Thermo Scientific, ABD).

Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan cihazlar; Araştırma Mikroskobu (Olympus, Japonya), Eppendorf Santrifüj 5810 R (Isolab), CO<sub>2</sub> inkübatör (Nüve, EC160), Olympus CKX41 ters faz kontrast mikroskobu (Nikon Eclips Tİ-U), PH ölçer (MettlerToledo, ABD), WiseMix Vortex (WisMix DaihanVM10), -80°C dondurucu (Haier, DW-86L628), -20°C (Haier, DW-40L508), ELISA plaka okuyucusu (Multiskan™GO- Thermo Scientific, ABD), Çalkalayıcı Su Banyosu (Nüve, ST30-22), Laminer Akış ve Biyogüvenlik Kabinleri (Bilser BLF 200), Heracell 150 CO<sub>2</sub> inkübatör (Heraeus-Thermo Scientific, ABD), Thoma Lamı (Marienfeld), Multi pipet (Eppendorf), Cryotubes (Eppendorf), Pasteur pipetleri (Eppendorf).

##### 3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Antioksidan aktivite ve fenolik içerik tayininde kullanılan kimyasallar ve sarflar; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich-Germany), AlCl<sub>3</sub> (Sigma Aldrich-Germany), NaNO<sub>2</sub> (Merc, Germany), Gallik Asit (Sigma-Aldrich-Germany), Troloks (Sigma-Aldrich-Germany), DPPH· (Sigma-Aldrich-Germany), ABTS<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich-Germany), Etanol (Merc, Germany), EDTA (Sigma-Aldrich-Germany), K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Sigma-Aldrich-Germany), Folin-Ciocalteu Reaktifi (Merck-Germany), NaOH (Merck-Germany), Ferrozin (Sigma-Aldrich-Germany), FeCl<sub>2</sub> (SigmaAldrich-Germany), XTT kiti (Biological Industries, Israel), Hekzan

(Sigma-Aldrich-Germany), Metanol (Merck-Germany), 0.45 µm Enjektör filtresi (Millipore, Almanya), çeşitli pipet uçları (Isolab)

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hatları ve besiyerleri; adenokarsinom (HT-29) ATCC (American Type Culture Collection, LGC Promochem, UK) firmasından ticari olarak temin edilmiştir. %1 L-Glutamin ve %1 Pen Strep solüsyonu içeren bir McCoy's 5A ortamında büyütüldü. Hücreler, 37 °C'de, % 95 nemde ve % 5 CO<sub>2</sub> koşullarında çoğaltıldı.

### 3.1.3. Deney materyali

Deney materyali olarak kullanılan *Euphorbia macroclada* Boiss. sonbahar mevsiminde 20.11.2021 tarihinde Van'ın İpekyolu ilçesi Yalınagaç Mahallesi dağlık alanında toplanarak Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırma laboratuvarında incelendi. Bitki teşhisi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü hocalarından Araş. Gör. Hüseyin EROĞLU tarafından yapılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Ekstraksiyon

*E. macroclada* türünün yaprak ve çiçek kısımları direk güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde kurutuldu ve kullanılacağı zamana kadar -20°C derecede muhafaza edildi. Çalışmaya ilk olarak bitki kısımları öğütücü ile öğütülerek eşit gramajlarda tartıldı. Aynı cam malzemelere alınarak üzerilerine sırasıyla hekzan, etanol, su ve aseton çözücüler eklendi. Hassas terazide 8'er gr tartılan toz haldeki bitki kısımlarının üzerilerine 75 mL hekzan konularak 40°C 'de 8 saat süreyle ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bırakıldı. Örneklerden hekzan süzüldü ve tüpte kalan bitki örneklerinin üzerine 75 mL etanol eklenerek 48 saat inkubasyona bırakıldı. 48 saat sonunda etanol süzüldü ve etanol uçması sağlandıktan sonra bitki örneklerinin üzerine 100 mL su eklendi ve 48 saat inkübe edildi. Karışımdan su süzüldü 50 mL'lik falcon tüplere alındıktan sonra 45° lik açı ile -80°C de 1 gece kalacak şekilde konuldu. 8'er gr tartılan kurutulmuş bitki kısımlarından aseton ekstresi de alınmıştır. Örnekler -80 °C den çıkarıldıktan sonra liyofilizatörde 72

saat bekletilerek su uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstreler analizler yapılncaya kadar - 20°C’de saklandı. Verim yüzdesi aşağıda belirtilen “Eş 3.1” e göre hesaplandı.

$$\text{Verim Yüzdesi (w/w)} = (\text{Kurutulmuş ekstrakt kütlesi} / \text{toplam mantar kütlesi}) \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.2.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

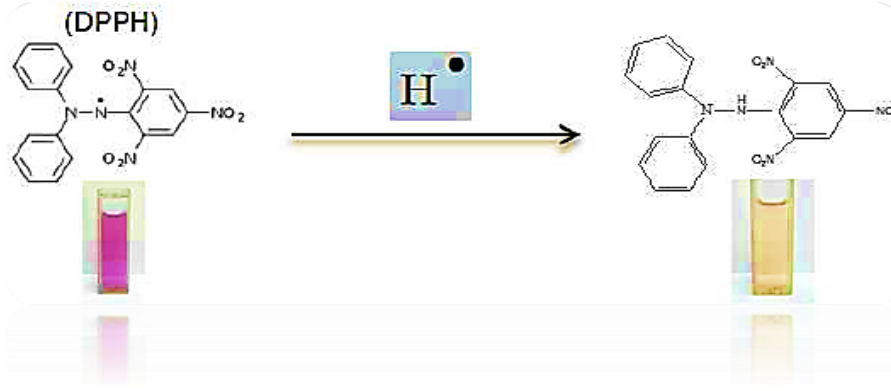
#### 3.2.2.1. DPPH serbest radikal yakalama aktivitelerinin belirlenmesi

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi DPPH radikalini yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçüldü. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodunun (1958) modifiye şekline göre yapıldı. *E. macroclada* ekstrelerinin DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) serbest radikal giderme aktivitesinin ölçümünde standart olarak kuersetin kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda *E. macroclada* ekstreleri hazırlandı. 0,05 mg/ml DPPH metanolda çözüldü ve kullanılmadan önce 30 dk boyunca sonike edildi. Modifiye edilmiş metoda göre *E. macroclada* ekstreleri ve standartlardan, her bir mikro plaka kuyucuğuna 10 µl bitki ekstresi koyuldu ve üzerlerine 140 µl DPPH eklendi. 20 dk boyunca inkubasyona maruz bırakıldıktan sonra 517 nm de absorbans değerleri ölçüldü. Hidrojen bağlama kapasitesi bu yöntemle belirlendi. Serbest radikal yakalama aktiviteleri yüzde olarak aşağıdaki “Eş 3.2” göre hesaplandı ve DPPH radikal yakalama aktivitesi her bir örnek için EC<sub>50</sub> değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı;

$$\% \text{ RSA (Radikal süpürme aktivitesi)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.2)$$

A<sub>0</sub>: Blank absorbansı

A<sub>1</sub>: Ekstre absorbansı



Şekil 3.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi (Cahyana ve ark., 2015).

### 3.2.2.2. ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi

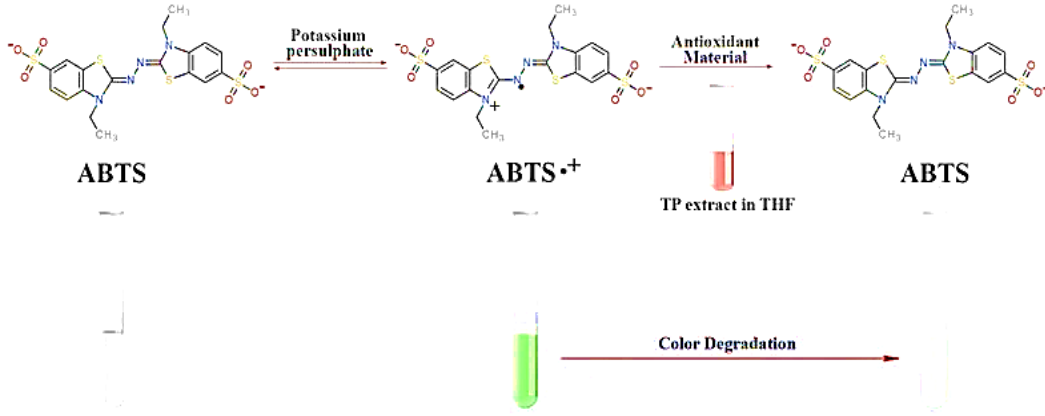
Serbest radikal temizleme kapasitesi ABTS (2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metodun modifiye edilmiş şekline göre belirlendi. İlk olarak 7 Mm ABTS çözeltisi 2,45 Mm potasyum persülfat çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışım en az 16 saat olacak şekilde karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra karışım 350 µl ABTS radikaline 10 ml etanol eklenerek 734 nm' de 0,70 (± 0.02) absorbans aralık değeri elde edilecek şekilde seyreltildi.

Farklı konsantrasyonlarda ekstre ve standart bileşen mikropılaka kuyucuklar içerisine 3 tekrar olacak şekilde koyuldu ve üzerilerine 147,5 µl seyreltilmiş ABTS radikali koyuldu. Karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 6 dk inkübasyon edildikten sonra 734 nm de absorbans değerleri ölçüldü. Bu çalışma için troloks standart olarak kullanıldı. Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri serbest radikal temizleme kapasitesini göstermek için kullanılmıştır. Yüzde inhibisyon, aşağıda gösterilen "Eş 3.3" kullanılarak hesaplandı;

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.3)$$

A<sub>0</sub>: Blank Absorbans

A<sub>1</sub>: Ekstre Absorbans



Şekil 3.2. ABTS radikal giderme aktivitesi (Üstündaş ve ark., 2018).

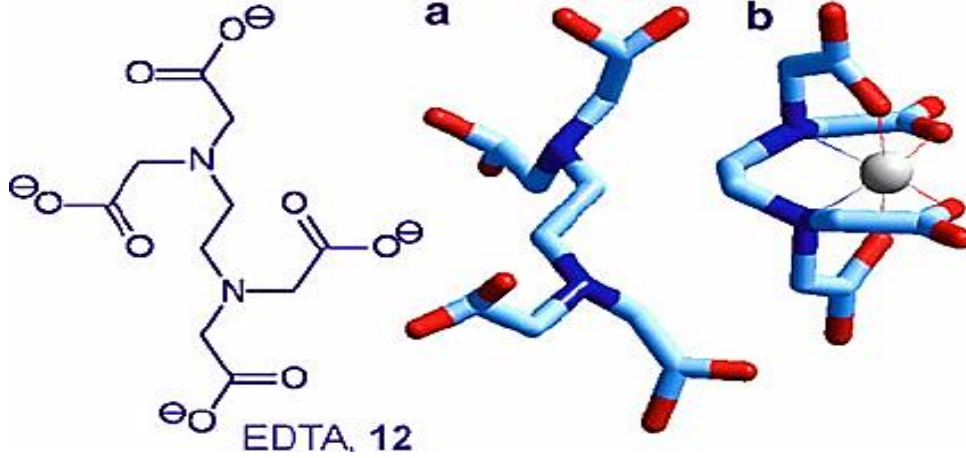
### 3.2.2.3. Metal şelatlama etkisi

Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre gerçekleştirildi. Standart olarak EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) kullanıldı. 96 kuyucuklu plaka içerisine 50 µL çeşitli konsantrasyonlarda EDTA ve ekstre eklendi. Üzerine 185 µL saf su eklendikten sonra 5 µL 2 mM FeCl<sub>2</sub> eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 µL 5 mM Ferrozin eklendi. 10 dakika daha oda sıcaklığındaki inkübasyondan sonra 562 nm'de absorbans okuması gerçekleştirildi. Sonuçlar EC<sub>50</sub> değerleri olarak ifade edildi. Her bir test en az üç kez tekrar edildi. Yüzde inhibisyon, aşağıda gösterilen “Eş 3.4” kullanılarak hesaplandı;

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.4)$$

A<sub>0</sub>: Blank Absorbans

A<sub>1</sub>: Ekstre Absorbans



Şekil 3.3. Metal şelatlama reaksiyon modellemesi (Fabbrizzi, 2011).

#### 3.2.2.4. Toplam fenolik madde içeriği

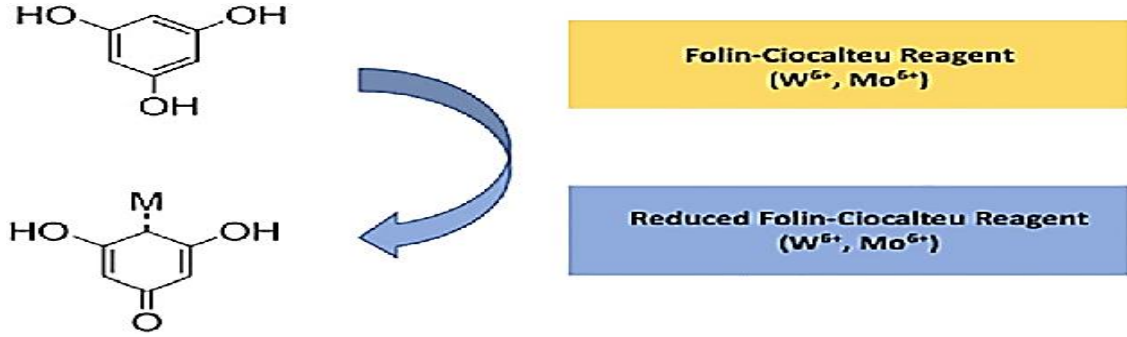
*Euphorbia macroclada* ekstralarında bulunan toplam fenolik madde içeriği Singleton ve Rossi (1965)' nin uyguladığı yöntemin modifiye şekline göre belirlendi. Standart olarak çeşitli konsantrasyonlarda gallik asit kullanıldı. Bu yöntemde öncelikle mikro plaka kuyucuğuna 80 µl saf su eklendi. Daha sonra ekstre ve standartlardan 20 µl mikro plaka kuyucuklarına konuldu. Üzerlerine 20 µl Folin reaktifi eklendi ve pipet ile karıştırıldı. Ardından üzerlerine 80 µl %10'lik (w/v) sodyum karbonat eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonrası 750 nm'de örnek yerine 20 µl su içeren köre karşı absorbans okundu. Gallik asit ile oluşturulmuş standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak her 1 mg ekstre içinde bulunan toplam fenolik içerik miktarları aşağıdaki "Eş 3.5" e göre hesaplandı;

$$\text{Ekstre yüzdesi(w/w)} = ((A_1 - A_0) / y \text{ değeri}) / \text{dilüsyon katsayısı} \times 100 \quad (3.5)$$

$A_0$ : Kontrolün absorbansı,

$A_1$ : Ekstrenin absorbansı,

y değeri: Standart grafiği denkleminde oluşan y değeri



Şekil 3.4. Folin-Ciocalteu reaksiyonu (Ford ve ark., 2019).

### 3.2.2.5. Toplam flavonoid madde içeriği

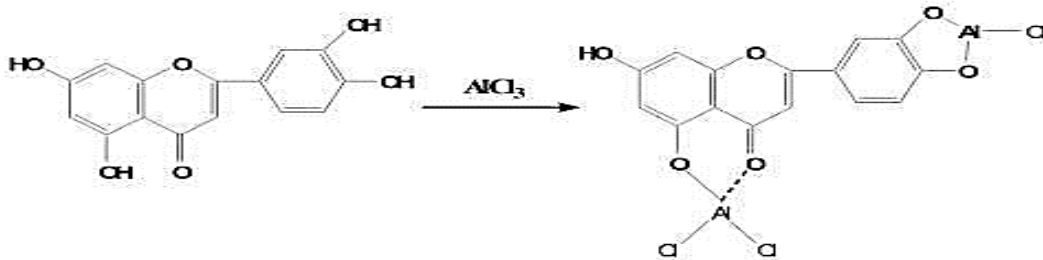
Toplam flavonoid miktarları, Zhishen ve arkadaşlarının (1999) modifiye edilmiş yöntemine göre saf su ekstraları ve metanol ekstraları içerisinde belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda kuersetin ve kateşin % 99,5 etanol ile çözüldü ve TFİ belirlenmesinde standart olarak kullanıldı. Metoda göre, 80 µl dH<sub>2</sub>O içeren mikropilaya kuyucuklarına, 20 µl standart veya örnek eklendi ardından % 5'lik NaNO<sub>2</sub>'den 6 µl kuyucuklara eklendi. 5 dk sonra 6 µl % 10 alüminyum klorid (AlCl<sub>3</sub>) kuyucuklara eklendi ve 6 dk sonra 1 M NaOH'ten 40 µl ilave edildi. Toplam hacim dH<sub>2</sub>O ile 200 µl'ye tamamlandı. 510 nm'de absorbans değerleri elde edildi. Toplam flavonoid içeriği 1 mg ekstre içerisindeki flavonoid miktarı olarak, kuersetin ve kateşin standart grafiklerine göre hesaplandı (Pal ve ark., 2010). Toplam flavonoid madde miktarları aşağıda gösterilen "Eş 3.6" e göre hesaplandı;

$$\text{Ekstre yüzdesi(w/w)} = ((A_1 - A_0) / y \text{ değeri}) / \text{dilüsyon katsayısı} \times 100 \quad (3.6)$$

A<sub>0</sub>: Kontrolün absorbansı,

A<sub>1</sub>: Ekstrenin absorbansı,

y değeri: Standart grafiği denkleminde oluşan y değeri



Şekil 3.5. Kuersetinin AlCl<sub>3</sub> ile reaksiyonu (Chang ve ark., 2002).

### 3.2.3. *E. macroclada* ekstralarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

#### 3.2.3.1. HT-29 hücre çoğaltılması

Kolorektal adenokarsinom hücresi (HT-29) kullanıldı. Bu hücre hattı % 10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 L-Glutamin ve %1 Pen Strep solüsyonu içeren bir McCoys 5A ortamında büyütüldü. Hücreler, 37 °C’de, % 95 nemde ve % 5 CO<sub>2</sub> koşullarında çoğaltıldı.

#### 3.2.3.2. *E. macroclada* ekstralarının hücreler üzerine sitotoksik etkilerinin incelenmesi

*E. macroclada* ekstralarının hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri, Hücre Çoğalması XTT Kiti kullanılarak incelendi. Metabolik olarak aktif olan hücrelerde XTT tetrazolyum tuzu mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile suda çözünebilen, portakal rengi formazon maddesine dönüştürülür. Bu teknikte oluşacak olan formazan miktarının ölçülmesi esastır. Bu portakal renkli formazan maddesi 470 nm de Elisa Plate Reader kullanılarak ölçüldü.

Öncelikle tripan mavisi ile hücre canlılığı sayımı yapıldı. Tripan mavisi ölü-hücreleri yani hücre bütünlüğü bozulmuş hücreleri maviye boyar ve canlı hücreler boyayı içerisine almadığından renksiz görünürler. Besi yerine ekilen hücreler, 37 °C’de ve % 5 CO<sub>2</sub> koşullarında 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücreler 5 ml PMS ile 2 kez yıkandı. Hücreler 2 ml tripsin ile kaldırılıp, 8 ml taze ortam kuyucuklara eklendi. Hücre süspansiyonu 2 ayrı falkona alındı, hücreler tripan mavisi (0.25 M) ile 1-1 ya da 1:9 oranında seyreltme yapılarak sayıldı.

Hücre sayımı hemacytometer kullanılarak, ışık mikroskobu altında yapıldı. Hemacytometer, her biri 1 mm<sup>2</sup> hacimli 9 kareden oluşmaktadır. Sayma alanı 25 geniş kare ve bu 25 geniş karenin içerisinde 16 küçük kareden oluşmaktadır. Hücreler 5-6 kere sayıldı ve bu sayımların ortalaması aşağıdaki formülde kullanılarak, her ml’deki hücre sayısı aşağıdaki “Eş 3.7” e göre belirlendi.

$$\text{Total Hücre/mL} = (\text{Sayılan Total Hücre} \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 104) \times \text{\#of Squares (3.7)}$$

96 kuyucuklu plakalara 100.000 hücre/mL olacak şekilde 100 µl hücreler ekildi. CO<sub>2</sub> inkübatörde 24 saatlik inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki ortam alınacak, kuyucuklar 50 PMS ile iki kez yıkandı. Kullanışlı absorbans değerleri elde edebilmek için PMS kullanıldı. 50 µl taze ortam kuyucuklara eklendi. İkinci sırada 50 µl büyüme ortamı tekrar eklendi, üçüncü sırada ise 50 µl % 0.2' lik DMSO kontrol olarak eklendi. Seri seyreltme tekniğiyle ekstreler seyreltilerek hücreler 50 µl e uygulandı. 36 saatlik bekleme sonrasında XTT kimyasalı hücrelere uygulandı. XTT ile muamale edildikten 10 saat sonra 470 nm de absorbanslar okundu. Çıkan sonuçlara göre % hücre canlılığı hesaplandı.

### **3.2.4. Bitkinin fenolik içeriğinin LC-MS analizleriyle belirlenmesi**

#### **3.2.4.1. Sıvı kromatografisi-yüksek çözünürlük kütle spektrometrisi (LC-HRMS) cihazı**

LC-MS analizleri, DIONEX UltiMate 3000 RS pompası, DIONEX UltiMate 3000 RS otomatik numune alıcısı ve DIONEX UltiMate 3000 RS kolon firmı içeren LC sistemi ve ısıtmalı elektrosprey iyonlaşma arayüzüne sahip Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) yüksek çözünürlüklü MS bileşimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Orbitrap-MS cihazı, bir otomatik şırınga enjektörü (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak pozitif (Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution) ve negatif kalibrasyon (Pierce™ Negative Ion Calibration Solution) solüsyonları ile kalibre edilmiştir.

Yapılan LC-MS analizlerinde LC ve MS kısmı sistem bilgisayarına yüklenmiş olan TraceFinder 3.2 (Thermo Scientific) programı ile eş zamanlı olarak çalıştırılmış, veriler Xcalibur software version 2.1.0.1140 (Thermo Fisher Scientific) programı ile toplanılarak kaydedilmiştir.

#### **3.2.4.2. Kromatografi ve yüksek çözünürlüklü ms koşulları**

Gerçekleştirilen analizler bir Phenomenex® Gemini® 3µm NX-C18 110 Å (100 mm × 2mm) kolon kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 30 °C olarak dağıtırıldı. Elüsyon gradiyentinde hareketli A fazında Ultrapure su sistemi (GFL 2004/ Human power 1) ile

elde edilen ultra safsu da hazırlanmış % 2 (v/v) glasiyel asedik asit, hareketli B fazında %99,9 saflıkta LC-MS derecede metanol (Sigma) kullanılmıştır.

Ayırım, numune enjeksiyon hacmi 20,0 µL ve 0,3 mL/dk akış hızında gradiyent elüsyon koşulları Şekil 1’de belirtilen durumlara göre gerçekleştirildi. Analiz süresi toplam 20 dakika olarak ayarlandı.

### **3.2.5. İstatiksel analiz**

Toplam fenolik ve antioksidan içerikleri GraphPad Prism 6 istatiksel analiz programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ve student t-test uygulanarak  $p<0.005$  anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Verim

*E. macroclada* bitki örnekleri öğütücü ile toz haline getirildikten sonra sırasıyla hekzan, etanol ve su içerisinde ekstraksiyon bölümünde belirtildiği gibi belli sürelerde manyetik karıştırıcı ile çalkalanmaya bırakıldı. Sırasıyla elde edilen sıvılardan hekzan ve etanol çözücülerini evaporatör yardımıyla uçuruldu. Etanolden ekstrenin ağırlığı hassas terazi ile tartılıp verimi hesaplandı. Hekzan için kayda değer bir ekstre elde edilemediği için verimi hesaplanamadı. Su ekstresi; posadan geriye kalan sıvı falkon tüpler içerisinde donduruldu ve daha sonra liyofilizatör ile suyu kurutuldu. Kalan kısım bitkinin su ekstresi şeklinde deneylerde kullanılmak için tartıldı ve verimi materyal metot kısmında verilen denkleme göre hesaplandı. *E. macroclada* 'nın bitki kısımlarından elde edilen verim Çizelge 4.1' de belirtildi.

Çizelge 4.1. *Euphorbia macroclada* ekstratlarının ekstraksiyon verimleri

Ekstraksiyon	İlk ağırlık (gr)	Son ağırlık(gr)	Verim (%)
Aseton Çiçek	8	2.852	35.65
Etanol Çiçek	8	0.804	10.05
Etanol Yaprak	8	1.075	13.437
Su Çiçek	8	0.756	9.45
Su Yaprak	8	0.9807	12.258

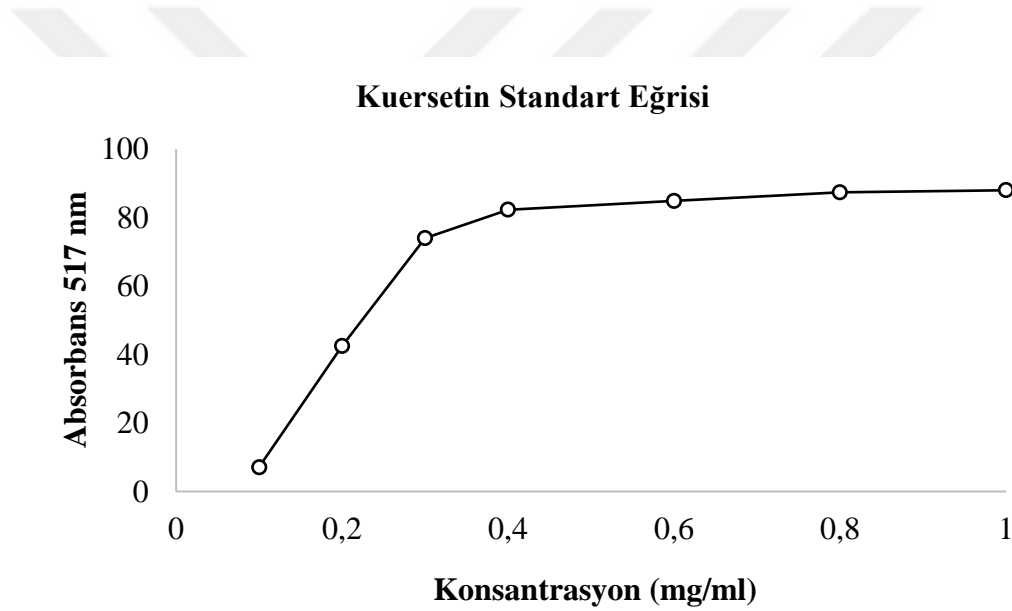
### 4.2. Antioksidan Aktivitesi Bulguları

#### 4.2.1. DPPH• radikalini giderme bulguları

DPPH testi, bir antioksidan molekülün serbest radikal temizleme potansiyelinin ölçülmesine dayanan ve renk değişimi ile değerlendirilen sıklıkla kullanılan kolay bir yöntemdir. Metanol içerisinde sonikatör yardımıyla çözdürülen DPPH radikali mor renk verir.

Bu yöntemin temel prensibi DPPH radikalinden bir hidrojen alınarak indirgenmesi ilkesine dayanır. Bu indirgenme neticesinde Şekil 3.1’de görüldüğü gibi mor renk olan çözelti sarı renge döner. Renk değişimi kalorimetrik olarak izlenir ve antioksidan özellikler için parametreleri belirlenmesinde kullanılır.

Bu yöntem sisteminin stabil bir serbest radikal olan DPPH tan bir H atomu aldığını tespit eden Blois (1958) tarafından geliştirilmiştir. Bu test için kuersetin standart olarak kullanıldı ve çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kuersetin çözeltisiyle Şekil 4.1’de verilen grafik elde edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda *E. macroclada* kuru ekstraktlarından elde edilen DPPH radikalini süpürme aktiviteleri Çizelge 4.2’de belirtildi. Elde edilen değerler üç bağımsız denemenin ortalama  $\pm$ SS temsil etmektedir.



Şekil 4.1. Kuersetin standart eğrisi.

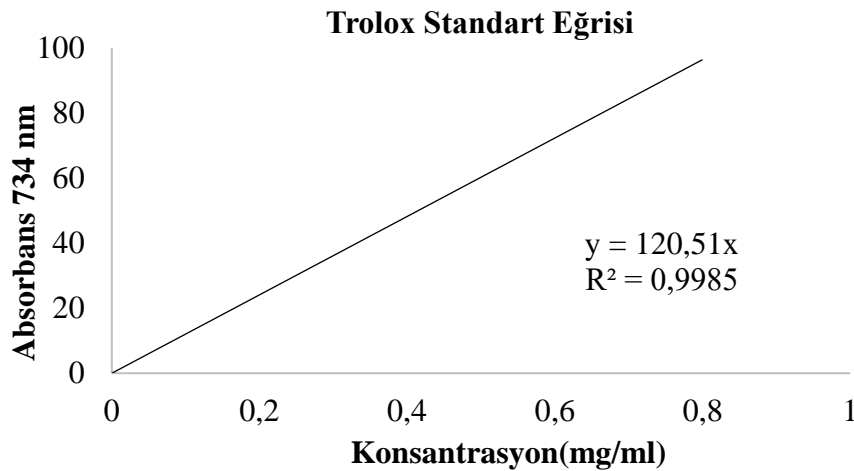
Çizelge 4.2. *E. macroclada* türünün çiçek ve yaprak ekstralarının DPPH radikalini giderme aktivitesi

<i>E. macroclada</i>	Çiçek EC <sub>50</sub> (µg/g) n;4			Yaprak EC <sub>50</sub> (µg/g) n;4	
	Aseton	Etanol	Su	Etanol	Su
<b>DPPH</b>	74.17 ± 0.1 <sup>a</sup>	87.11 ± 0.1 <sup>b</sup>	84.53 ± 0.3 <sup>c</sup>	68.23 ± 0.8 <sup>d</sup>	61.28 ± 0.2 <sup>e</sup>

\*Aynı tablo içinde farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p <0.0005).

#### 4.2.2. ABTS<sup>+</sup> radikalini giderme bulguları

ABTS radikalini giderme testi bazı modifikasyonlar yapılarak *E. macroclada* ekstralarına uygulandı. 2,5 µl ekstre 96'lık mikropılaka kuyucukları içerisine üç tekrar olacak şekilde koyuldu ve üzerine 147,5µl seyreltilmiş ABTS radikali koyuldu. Karanlık bir ortamda 6 dk bekletildikten sonra 734 nm de absorbans değerleri kalorimetrik olarak ölçüldü. Bu çalışma için troloks standart olarak kullanıldı. Troloks eş değeri kullanılarak elde edilen standart grafiği Şekil 4.2' de gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *E. macroclada* kuru ekstralarından elde edilen ABTS radikalini süpürme aktiviteleri Çizelge 4.3' de belirtildi. Elde edilen değerler üç bağımsız denemenin ortalama ±SS temsil etmektedir.



Şekil 4.2. Trolox standart eğrisi.

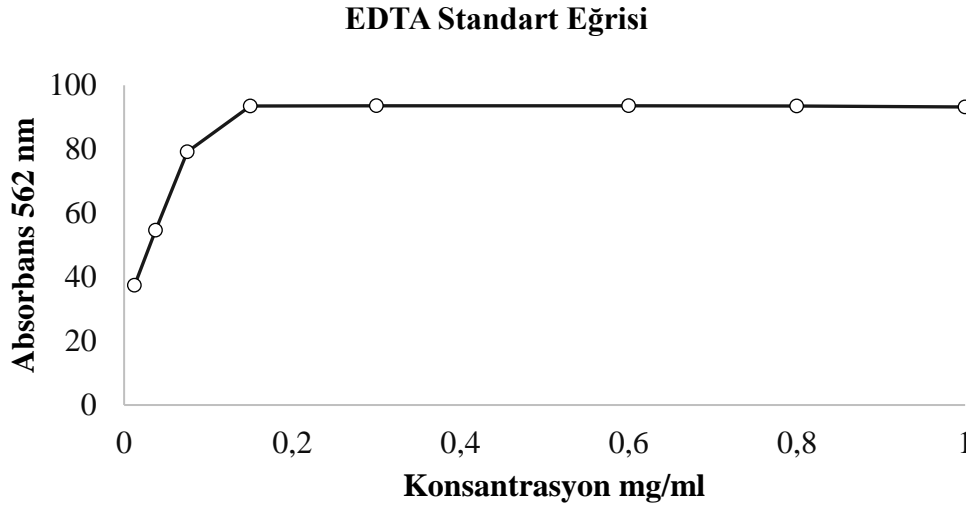
Çizelge 4.3. *E. macroclada* türünün çiçek ve yaprak ekstralarının ABTS radikalini giderme aktivitesi

<i>E. macroclada</i>	Çiçek EC <sub>50</sub> (µg/g) n;4			Yaprak EC <sub>50</sub> (µg/g) n;4	
	Aseton	Etanol	Su	Etanol	Su
<b>ABTS</b>	63.44 ± 0.3 <sup>a</sup>	53.76 ± 0.6 <sup>b</sup>	62.9 ± 0.1 <sup>e</sup>	60.41 ± 0.2 <sup>d</sup>	84.43 ± 0.8 <sup>e</sup>

\*Aynı tablo içinde farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p <0.0005).

#### 4.2.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları

*E. macroclada* ekstralarının metalleri bağlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdikleri yöntemle belirlendi. Bu yöntemde temel prensip materyal metot kısmında da belirtildiği gibi ekstralarda bulunan metal bağlama yeteneğine sahip antioksidanlar ile çok güçlü bir Fe<sup>+2</sup> şelatlayıcı olan ferrozin reaktifinin rekabetine dayanır. Kuru ekstrede metal bağlama yeteneği olan antioksidan miktarı ne kadar fazla ise ferrozin bileşiğinin oluşumu o derece engellenir ve bu durumda bileşikten kaynaklı kırmızı renk o kadar açık olur. Bu çalışma da pozitif kontrol için güçlü bir metal şelatlayıcı olan EDTA kullanıldı. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan EDTA örnekleriyle oluşturulan standart ölçümleme eğrisi Şekil 4.3' de verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *E. macroclada* kuru ekstralarından elde edilen metal şelatlama aktiviteleri Çizelge 4.3' de belirtildi. Elde edilen değerler üç bağımsız denemenin ortalama ±SS temsil etmektedir.



Şekil 4.3. EDTA standart eğrisi.

Çizelge 4.4. *E. macroclada* türünün çiçek ve yaprak ekstralarının şelatlama aktivitesi

<i>E. macroclada</i>	Çiçek EC <sub>50</sub> (µg/g) n;4			Yaprak EC <sub>50</sub> (µg/g) n;4	
	Aseton	Etanol	Su	Etanol	Su
<b>Metal Şelatlama</b>	62.65 ± 0.3 <sup>a</sup>	68.63 ± 0.5 <sup>b</sup>	69.73 ± 0.7 <sup>c</sup>	64.14 ± 0.2 <sup>d</sup>	64.76 ± 0.2 <sup>d</sup>

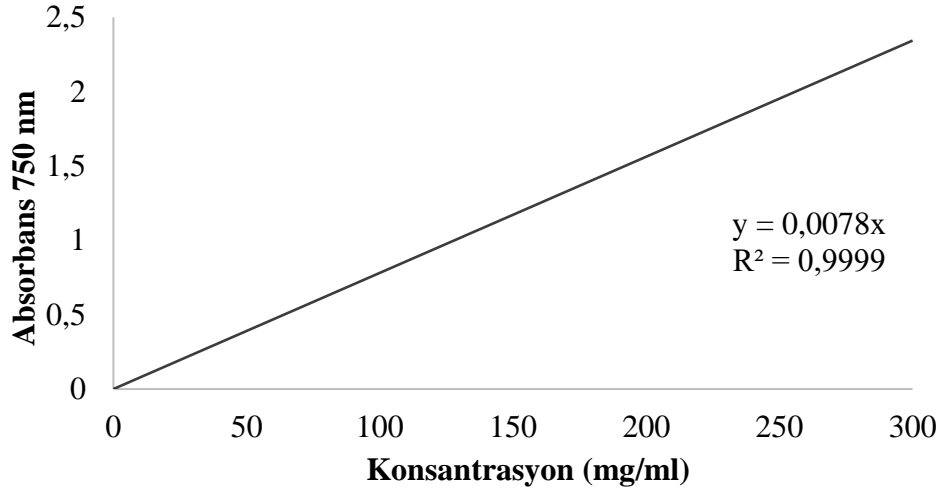
\*Aynı tablo içinde farklı üst-yazılarla (a, b, c ve d) işaretlenmiş olan verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p < 0.0005).

#### 4.2.4. Toplam fenolik madde miktarı bulguları

*E. macroclada* ekstralarında toplam fenolik madde içeriği Singleton ve Rossi' nin 1965 yılında geliştirdiği ve mikro düzeye modifiye edilerek kullanılan yöntemle belirlendi. Toplam fenolik madde düzeyini belirlemek için etkili bir fenolik bileşik olan gallik asit kontrol olarak kullanıldı.

Gallik asit standart grafiği Şekil 4.4 'de gösterilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri şeklinde hesaplandı. Yapılan çalışmalar sonucunda *E. macroclada* kuru ekstralarından elde edilen toplam fenolik madde içerikleri Çizelge 4.5' de belirtildi. Elde edilen değerler üç bağımsız denemenin ortalama ±SS temsil etmektedir.

### Gallik Asit Standart Eğrisi



Şekil 4.4. Gallik asit standart eğrisi.

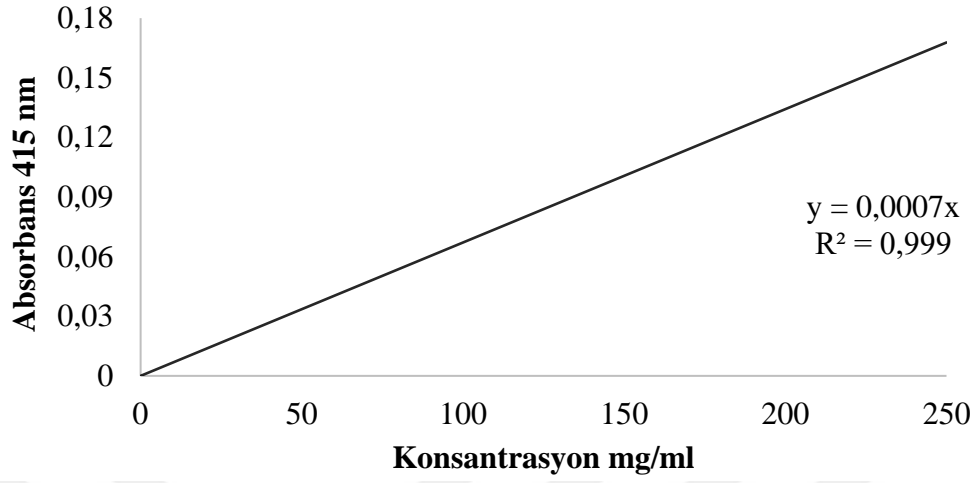
Çizelge 4.5. *E. macroclada* türünün çiçek ve yaprak ekstralarının toplam fenol içeriği

<i>E. macroclada</i>	Çiçek ( $\mu\text{g/g}$ kuru ekstre) n;4			Yaprak ( $\mu\text{g/g}$ kuru ekstre) n;4	
	Aseton	Etanol	Su	Etanol	Su
<b>Toplam Fenol (Gallik Asit Eşdeğeri)</b>	$407.9 \pm 1.1^a$	$838.8 \pm 0.5^b$	$990.2 \pm 0.2^c$	$805 \pm 0.8^d$	$675.5 \pm 0.3^e$

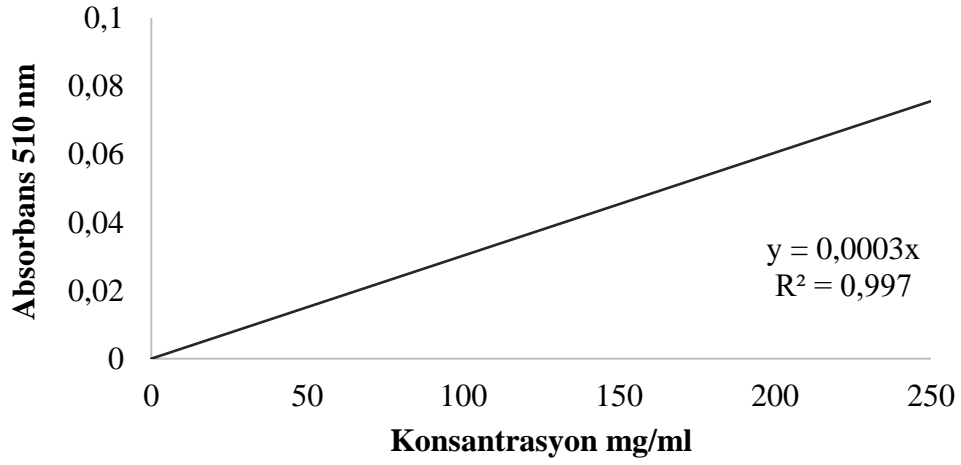
\*Aynı tablo içinde farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir ( $p < 0.0005$ ).

#### 4.2.5. Toplam flavonoid madde miktarı bulguları

*E. macroclada* ekstralarının toplam flavonoid madde miktarını belirlemek için Zhishen ve arkadaşlarının 1999 yılında geliştirdiği ve alimünyum klorid eklenmesinden kaynaklı renk değişimi prensibine dayanan metoda göre yapıldı. Bu deneyde kuru ekstradaki toplam flavonoid madde içeriğini belirlemek için kateşin ve kuersetin standart olarak kullanıldı. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kateşin ve kuersetinden kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu grafikler Şekil 4.2.5 ve Şekil 4.2.6 'da belirtildi. Yapılan çalışmalar sonucunda *E. macroclada* kuru ekstralarından elde edilen toplam flavonoid madde içerikleri Çizelge 4.6' da belirtildi. Elde edilen değerler üç bağımsız denemenin ortalama  $\pm$ SS temsil etmektedir.

**Kuersetin Standart Eğrisi.**

Şekil 4.5. Kuersetin standart eğrisi.

**Kateşin Standart Eğrisi**

Şekil 4.6. Kateşin standart eğrisi.

Çizelge 4.6. *E. macroclada* türünün çiçek ve yaprak ekstralarının toplam flavonoid içeriği

<i>E. macroclada</i>	Çiçek (µg/g kuru ekstre) n;4			Yaprak (µg/g kuru ekstre) n;4	
	Aseton	Etanol	Su	Etanol	Su
<b>Toplam Flavon (Kuersetin Eşdeğeri)</b>	741.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	1138 ± 3.1 <sup>b</sup>	1073 ± 1.4 <sup>c</sup>	943.6 ± 0.4 <sup>d</sup>	783.6 ± 1.1 <sup>e</sup>
<b>Toplam Flavon (Kateşin Eşdeğeri)</b>	371.4 ± 11 <sup>a</sup>	481.7 ± 1.1 <sup>b</sup>	454.4 ± 0.3 <sup>c</sup>	413.9 ± 1.4 <sup>d</sup>	453.3 ± 1.4 <sup>e</sup>

\*Aynı tablo içinde farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p <0.0005).

### 4.3. Bitkinin Fenolik İçeriğinin LC-MS Analiz Bulguları

Bu yöntem, sıvı kromatografisinin fiziksel ayırma yeteneğine kütle spektrometrisinin kütle farklılaşma kapasitesinin kombinasyonundan oluşmaktadır. Ekstrelerdeki fenolik bileşiklerin saptanması için oldukça hassas ve uygun bir yöntemdir.

Fenolik bileşikleri saptamak için 5 farklı standart kullanılmıştır. Kullanılan bu 5 farklı bileşik için *Euphorbia macroclada* çiçek ve yaprak bölümlerinin aseton, etanol ve su ekstralarının LC-MS sonuçları; gallik asit, kafeik asit, kateşin, kuersetin ve apigenin kromatogramları çizildi.

LC-MS analizi ile saptanan fenolik bileşik miktarları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, *E. macroclada*'nın su ve aseton ekstraları etanol ekstralarından daha fazla yüksek fenolik bileşik içeriğine sahiptir ve ayrıca apigenin sadece çiçeğin aseton ekstresinde tespit edilmiştir.

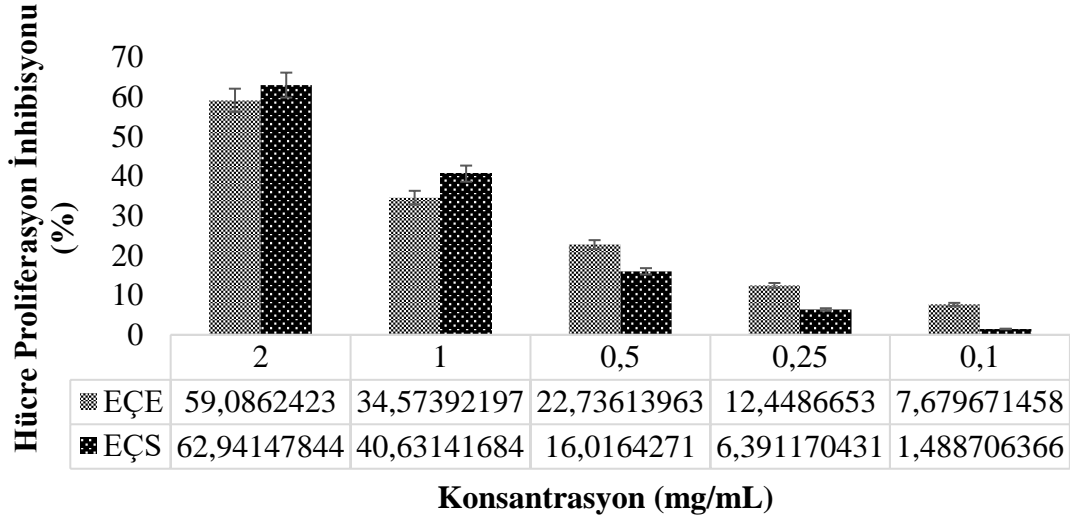
Çizelge 4.7. LC-MS analiz sonuçları

Bileşik Adı	R <sup>2</sup>	RT	Örnek (µg/g ekstre)				
			EYE	EYS	EÇE	EÇS	EÇA
Gallik asit	0.9963	2.05	227.142	593.542	275.191	729.75	23.235
Kafeik asit	0.9973	7.23	5.812	10.357	5.714	7.503	5.331
Kateşin	0.9970	6.34	7.093	32.299	7.18	26.506	13.446
Apigenin	0.9991	11.32	T.E	T.E	T.E	T.E	24.032
Kuersetin	0.9958	10.51	68.174	83.718	79.244	96.346	166.066

(RT: Alınma zamanı, T.E: Tespit edilemedi, EYE: Yaprak etanol ekstresi, EYS: Yaprak su ekstresi, EÇE: Çiçek etanol ekstresi, EÇS: Çiçek su ekstresi, EÇA: Çiçek aseton ekstresi.

#### 4.4. *Euphorbia macroclada* Türünün Antiproliferatif Aktivite Bulguları

*Euphorbia macroclada* türünün çiçek bölümünün su ve etanol ekstreleri insan kolon kanser hücre (HT-29) hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT yöntemi ile araştırıldı. 48 saat inkubasyon sonrası ekstraların test edilen hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda % hücre proliferasyon inhibisyonları Şekil 4.7 'de verilmiştir.



Şekil 4.7. *E. macroclada* türünün su etanol ekstresinin HT-29 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktivitesi.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde İçeriği

Doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif bileşenler insan sağlığına fayda sağlayabilir. Spurge familyasından (Euphorbiaceae) gelen Spurge (*Euphorbia*) bitkileri tüm dünyada yaygındır ve halk hekimliğinde farklı işlevler için kullanılmaktadır (Özbilgin ve Çitoğlu, 2012).

*Euphorbia* türleri üzerine yapılan biyolojik araştırmalar, geleneksel ilaçlarda birçok bitkinin kullanımını desteklemiş veya modern farmakolojik boyutlardaki yeni potansiyelleri ortaya çıkarmıştır. Sergilenen biyolojik aktiviteler çoğunlukla antiinflamasyon, antipiretik-analjezik, antikanser, antimikrobiyal, yumuşakça öldürücü, antifeedant aktiviteleri ve antioksidan içermektedir (Shi ve ark., 2008).

Barla ve ark., (2007) Türkiye'den toplanan üç *Euphorbia* türü olan *E. macroclada* Boiss. *E. acanthothamnos* Heldr., ve *E. rigida* Bieb. bitkilerini üç farklı çözücü kullanarak (etanol, aseton ve petrol eteri) antioksidan potansiyellerini araştırmıştır. *E. acanthothamnos* ekstresi tüm testlerde en aktif ekstrakt olduğu belirlenmiştir. *E. acanthothamnos*'un tüm ekstraktlarının TPC'si, diğer ekstraktlardan daha yüksek toplam fenolik içerik göstermiştir, en yüksek olanı etanolik ekstrakt olarak bulunmuştur. *E. macroclada*'nın aseton ekstraktı en yüksek TFC'yi gösterirken, etanolik ekstrakt en yüksek verimi sergilemiştir. DPPH testinde, *E. acanthothamnos*'un etanolik ekstraktının en aktif ekstrakt olduğu bulunmuştur.

Yine Aslı Barla ve arkadaşlarının (2007) *Euphorbia* türleri üzerine yaptıklarını bir çalışmada *E. macroclada*'nın aseton ve etanol ekstreleri alınmış ve fenol ve flavonoid içeriğine bakılmıştır. Flavonoid içeriği kuersetin eşdeğeri bakımından aseton ekstresinde 45 µg KE/mg ölçülmüşken fenol içeriği 28 µg PE/mg ölçülmüştür. Etanol ekstresine bakıldığında kuersetin eş değeri 34 µg KE/mg iken fenol içeriği 22 µg PE/mg ölçülmüş olup yaptığımız çalışmaya benzer olarak flavonoid içeriğinin fenol içerikten yüksek bulunulabileceği kanısını varılmıştır.

Yapılan diğerk çalışmada Muhammad Majid ve ark., (2015) toplam fenolik ve flavonoid içeriğine baktıkları *Euphorbia dracunculoides* bitkisinin en yüksek fenolik ve flavonoid içeriği etil asetat-su ekstresinde 17.35 mg GAE/g, 7.57 mg RE/g bulunmuştur.

Bu çalışmada, *E. macroclada*'nın çiçek ve yaprak bölümlerinden elde edilen aseton, etanol ve su ekstrelerinin antioksidan ve kolorektal adenokarsinom hücre hattı (HT-29) zerindeki hücre canlılığı etkileri bakımından analiz edilmiştir.

*E. macroclada*'nın aseton ekstresinin fenolik içeriği 407,9 mg GAE/g ölçülürken, etanol ekstresinin fenolik içeriği 838,8 mg GAE/g ve en yüksek aktivite gösteren su ekstresinin fenolik içeriği 990,2 mg GAE/g kuru ekstre olarak bulundu. Yapılan çalışmada *E. macroclada*'nın çiçeği kullanarak elde edilen üç farklı ekstrakta bakıldığında fenolik madde içeriği en yüksek su ekstresinde elde edildi. Su ve etanol ekstrelerinin aseton ekstresine oranla daha yüksek aktivite gösterdikleri gözlemlendi. Su ve etanol ekstrelerinin fenolik içeriği aseton ekstresinin fenolik içeriğinden 2 katı olduğu görülmektedir. *E. macroclada* bitkisinin diğerk bir kısmı olan yaprağından elde edilen su ve etanol ekstrelerinin toplam fenolik içerikleri ise sırasıyla su ekstresinin fenolik içeriği 675,5 mg GAE/g iken etanol ekstresinin fenolik içeriği ise 805 mg GAE/g olarak bulundu. Açıkça görülmekte ki bitkinin farklı kısımlarından elde edilen su ekstreleri arasındaki farkın çok olduğu ve çiçeğin yaprağa göre daha çok fenolik madde içerdiği gözlemlendi. Değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0005$ )

*E. macroclada*'nın toplam flavonoid içeriğine bakıldığında bitkinin içerdiği kuersetin eş değeri çiçek kısmının üç farklı ekstresinde aseton 741,7 QE/g, etanol 1138 QE/g ve su 1073 QE/g kuru ekstre olarak belirlendi. Yaprak kısmında ise; etanol 943,6 QE/g ve su 783,6 QE/g kuru ekstre olarak bulundu. Etanol ve su ekstresinin kuersetin içerikleri birbirlerine yakın olarak ölçüldü ve bu da demek oluyor ki kuersetin eş değeri hem çiçek hem de yaprakta bolca bulunmaktadır. Çiçek ve yaprak arasındaki kıyasa bakıldığında çiçeğin yaprağa oranla aktivitesinin daha fazla olduğu görüldü. Ekstrelerin içerdiği kateşin eş değerine bakıldığında ise çiçek ekstrelerinde aseton 371,4 KE/g, etanol 481,7 KE/g ve su 454,4 KE/g kuru ekstre olarak belirlendi. Kateşin eşdeğeri üç farklı ekstrede de düşük olarak ölçüldü ve aktivitelerinin birbirlerine yakın oldukları da gözlemlendi. Yaprak kısmının kateşin eş değeri etanol ekstresinde 413,9 KE/g iken su ekstresinde 453,3 KE/g kuru ekstre olduğu bulundu. Yaprak kısmında da kateşin eş değeri düşük olarak ölçüldü ve bu sonuçlara göre *E. macroclada* bitkisinde kateşin eş değerinin

oldukça az olduğu kanısına varılmıştır. Değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0005$ ).

## 5.2. Antioksidan Kapasite Sonuçları

Lawrence Monah ve ark., (2016) *Euphorbia* türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada *Euphorbia golondrina* türünün ABTS radikalini süpürme aktivitesi gallik asit ve betahidroksitoluen (BHT) 'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Muhammad Majid ve ark., (2015) *Euphorbia dracunculoides* bitkisi ile yaptıkları çalışmada DPPH testinde minimum  $EC_{50}$  değeri etil asetat-su ekstresinde  $144.7 \mu\text{g/ml}$  ölçülürken, metal şelatlama testinde ise minimum  $EC_{50}$  değeri etil asetat ekstresinde  $279.51 \mu\text{g/ml}$  olarak bulunmuştur.

Serbest radikal süpürücü olarak bir bileşik ya da ekstraktın kabiliyetini test etmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DPPH radikalini başlangıçtaki konsantrasyonunun %50'sinin azalması için gerekli olan antioksidan miktarı  $EC_{50}$  değeri olarak tanımlanmaktadır. Bu durum ekstrelerin  $EC_{50}$  değeri ne kadar az ise antioksidan aktivitesinin o kadar yüksek olduğu anlamına gelmektedir (Molyneux, 2004). Yaptığımız çalışmada *E. macroclada* bitkisinin antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS yapay radikallerini süpürme aktivitelerine ve metal şelatlama oranına bakıldı. DPPH radikalini süpürme aktivitesi için kontrol olarak kuersetin eş değeri kullanıldı. Bitkinin çiçek ve yaprak bölümlerinden elde edilen aseton, etanol ve su ekstrelerinin aktiviteleri incelendiğinde çiçek için; aseton  $EC_{50}$   $74,17 \text{ mg/ml}$ , etanol  $EC_{50}$   $87,11 \text{ mg/ml}$ , su  $EC_{50}$   $84,53 \text{ mg/ml}$  kapasitede radikal süpürdüğü görüldü. Bir diğer kısım olan yapraktan alınan ekstreler bakıldığında etanol ekstresinin radikal süpürme aktivitesi  $68,23 \text{ mg/ml}$  iken su ekstresi  $61,28 \text{ mg/ml}$  en yüksek DPPH radikali süpürme aktivitesi su ve etanol ekstrelerinde gözlemlendi. Bu verilere göre DPPH radikalini süpürme aktivitesini en çok yapraktan alınan su ekstresi gösterdi. ABTS radikalini süpürme aktivitesini ölçmek için kontrol olarak troloks eş değeri kullanıldı. Çiçekten elde edilen aseton, etanol ve su ekstrelerinin radikal süpürme aktiviteleri sırasıyla  $EC_{50}$ ;  $63,44 \text{ mg/ml}$ ,  $53,76 \text{ mg/ml}$  ve  $62,9 \text{ mg/ml}$  olarak belirlendi. Yapraktan etanol ve su ekstrelerinin  $EC_{50}$ ;  $60,41 \text{ mg/ml}$  ve  $84,43 \text{ mg/ml}$  olarak hesaplandı. Burdaki sonuçlara göre en yüksek ABTS radikalini

süpürme aktivitesini çiçekten alınan etanol ekstresinin gösterdiği belirlendi. Değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0005$ ).

Metal şelatlama aktivitesinde demir iyonu reaktif bir metal olduğundan fenton reaksiyonlarına katılması sebebiyle hidroksil radikallerinin oluşmasına yol açmaktadır. Bu yüzden şelatlama aktivitesinin oluşabilecek bir oksidatif hasarın ölçülmesi önemli bir parametredir. *E. macroclada*'nın metal şelatlama aktivitesi EDTA kullanılarak belirlendi. Çiçekten elde edilen aseton, etanol ve su ekstralarının  $EC_{50}$ ; 62,65 mg/ml, 68,63 mg/ml, 69,73 mg/ml olarak hesaplandı. Yaprak ekstralarının  $EC_{50}$ ; etanol 64,14 mg/ml, su 64,76 mg/ml olarak bulundu. Çiçek ve yapraktan alınan ekstraların metal şelatlama aktivitelerinin çok yakın olduğu gözlemlendi. En çok metal şelatlama aktivitesini aseton ekstresi gösterdi. Değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0005$ ).

### 5.3. *Euphorbia macroclada* Türünün Fenolik İçeriğinin LC-MS Analiz Sonuçları

Lawrence Monah ve ark., (2016) *Euphorbia* türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada *Euphorbia golondrina* türünün GC-MS sonuçlarında bitkide en bol bulunan bileşikler karyofilen oksit (% 14.16), kafur (% 9.41) ve fitol (% 5.75) olarak gösterilmiştir.

Muhammad Majid ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada *Euphorbia dracunculoides* bitkisinin etil asetat-su ekstresinin HPLC analizi sonucunda rutin, kateşin, kafeik asit ve miyrisetin standartları arasında maksimum miktarı 65.8 µg/mg ile rutin göstermiştir.

*E. macroclada*'nın çiçek ve yaprak bölümlerinin aseton, etanol ve su ekstraları, LC-MS yöntemi ile polifenol içerikleri açısından karakterize edildi.

Sonuçlar, aseton ve su ekstralarının daha fenolik olduğu ve en bol fenoliklerin gallik asit ve kuersetin olduğunu gösterdi.

### 5.4. *Euphorbia macroclada* Türünün Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

*Euphorbia macroclada* türünün çiçek bölümünün su ve etanol ekstraları kolorektal adenokarsinom (HT-29) kanser hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT yöntemi ile incelendi. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi çiçeğin etanol ve su ekstralarının HT-29 hücre hattı üzerinde inhibisyon miktarları görülmektedir. Her iki ekstrenin hücre üzerindeki canlılık inhibisyon değerleri birbirine oldukça yakın ölçüldü. Bu sonuçlara

göre iki ekstre de hücre içindeki sinyal yolları arasında fazla bağlantı kuramadıkları için yüksek aktivite gösterememişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, bu çalışmada kullanılan *Euphorbia macroclada* 'nın aseton, etanol ve su ekstralarının fenolik madde içerikleri, antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Toplam fenolik ve flavonoid içerik testlerinde çiçeğin etanol ekstresi etkiliyken LC-MS analizi sonucunda çiçeğin su ekstresinin daha fazla fenolik madde içerdiği gözlemlendi. Antioksidan aktivite testleri sonucunda en etkili sonuçlar çiçeğin aseton ekstresinde elde edildi. XTT testi analizindeki sonuçlara göre çiçeğin su ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri 1.916 mg/ml etanol ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri ise 1.790 mg/ml olarak hesaplandı. Elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p <0.0005).





## KAYNAKLAR

- Altundag, E., Ozturk, M., 2011. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, **19**: 756-777.
- Anonim, 2005. Medicinal And Aromatic Plants Working Group-ECP/GR.
- Barla, A., Öztürk, M., Kültür, Ş., Öksüz, S., 2007. Screening of antioxidant activity of three Euphorbia species from Turkey. *Fitoterapia*, **78** (6): 423-425.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansi, S., Yılmaz, G., Kızıl, O. A. S., Telci, İ., 2010. Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları. *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*. 11, 15.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün. *Nobel Tıp Kitabevleri*.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181** (4617): 1199-1200.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., 2004. Carotenoids: handbook. *Springer Science & Business Media*.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, **49** (6): 2774-2779.
- Cahyana, A. H., Wibowo, W., Pratama, A., Ardiansah, B., 2015. Synthesis, characterization and anti-oxidative properties of propolis-like compound prepared from prenylation of Indonesia's cinnamon (*Cinnamomum Burmannii*) essential oil using-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/NaOH. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **7** (1): 715-719.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Chern, J. C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **10** (3): 178-182.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, PC., 2004. Katalazlar arasında yapı ve özellik çeşitliliği. *Hücre ve Moleküler Yaşam Bilimleri CMLS*, **61** (2): 192-208.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, **324** (1): 1-18.
- Demirezer, L. Ö., 2010. Bitkilerin tıpta kullanılması konusundaki sorumluluklarımız. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, 5-6.
- Dias, F. D., 1994. L and Takahashi CS Cytogenetic evaluation of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia mutans* rose (*Zingerberaceae*) and *Pogostemon hyssopus* benth (*Labiatae*) on Wistar rats and *Allium cepa* (*Liliaceae*) root tip cells. *Brazilian Journal of Genetics*, **17** (2): 175-180.
- Dinis, T. C., Madeira, V. M., Almeida, L. M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics*, **315** (1): 161-169.
- Dringen, R., Pawlowski, P. G., Hirrlinger, J., 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of neuroscience research*, **79** (1-2): 157-165.
- Ersöz, T., 2010. Bitkisel ürünler ve Güvenilirliği. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, **5** (6).
- Ertekin, V., Selimoğlu, M. A., Altinkaynak, S., 2005. A combination of unusual presentations of *Datura stramonium* intoxication in a child: Rhabdomyolysis and fulminant hepatitis. *Journal of Emergency Medicine*, **28** (2): 227-228.

- Fabbrizzi, L., 2011. Living in a Cage Is a Restricted Privilege. *In Beauty in Chemistry*, 127-166.
- Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G. N., Walsh, P. J., 2019. A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, **30** (6): 587-599.
- Foti, M. C., 2007. Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **59** (12): 1673-1685.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*, **264** (14): 7761-7764.
- Gill, S. S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, **48** (12): 909-930.
- Góth, L., Rass, P., Páy, A., 2004. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*, **8** (3): 141-149.
- Güner, A., Aslan, S., 2012. Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler). *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları*.
- Halliell, B., 1996. Antioxidant in human health and diseases. *Annu Rev Nutr*, **16**: 33-50.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J. M., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food chemistry*, **83** (4): 547-550.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, **47** (10): 3954-3962.
- Kahraman, A., Serteser, M., Koken, T., 2002. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **3** (1).
- Koduru, S., Grierson, D. S., Afolayan, A. J., 2006 Antimicrobial Activity of Solanum aculeastrum. *Pharmaceutical biology*, **44** (4): 283-286.
- Krishnaraju, A. V., Rao, T. V., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H. S., Subbaraju, G. V., 2005. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *International Journal of Applied Science and Engineering*, **3** (2): 125-134.
- Landrum, J. T., 2009. Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties. *CRC press*.
- Lee, J., Koo, N., Min, D. B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **3** (1): 21-33.
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M., 2004. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, **108** (22): 4916-4922.
- Linster, C. L., Van Schaftingen, E., 2007. Vitamin C: biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS journal*, **274** (1): 1-22.
- Majid, M., Khan, M. R., Shah, N. A., Haq, I. U., Farooq, M. A., Ullah, S., Sajid, M., 2015. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. *BMC complementary and alternative medicine*, **15** (1): 1-15.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Ros, G., 2000. Nutritional importance of phenolic compounds in the diet. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, **50** (1): 5-18.

- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, **26** (2): 211-219.
- Morón, Ú. M., Castilla-Cortázar, I., 2012. Protection against oxidative stress and “IGF-I deficiency conditions”. *Antioxidant enzyme*, **89**.
- Nakamura, H., Nakamura, K., Yodoi, J., 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annual review of immunology*, **15** (1): 351-369.
- Namiki, M., 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **29** (4): 273-300.
- Ndam, L. M., Mih, A. M., Tening, A. S., Fongod, A. G. N., Temenu, N. A., Fujii, Y., 2016. Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Euphorbia golondrina* LC Wheeler (Euphorbiaceae Juss.): an unexplored medicinal herb reported from Cameroon. *Springerplus*, **5** (1): 1-15.
- Nimse, S. B., Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, **5** (35): 27986-28006.
- Olejniczak, K., Günzel, P., Bass, R., 2001. Preclinical testing strategies. *Drug information journal: DIJ/Drug Information Association*, **35** (2): 321-336.
- Özbilgin, S., Çitoğlu, G. S., 2012. Uses of some euphorbia species in traditional medicine in Turkey and their biological activities. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **9** (2).
- Özcan, A., Özcan, A. S., 2004. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. *Talanta*, **64** (2): 491-495.
- Pandey, B. P., 2006. A textbook of botany: Angiosperms, taxonomy, anatomy, embryology and economic botany. *Chand and Co., Ltd., Ram Nagar, New Delhi*.
- Peteros, N. P., Uy, M. M., 2010. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of four Philippine medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4** (5): 407-414.
- Pietta P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, **63** (7): 1035–1042.
- Ranelletti, F. O., Ricci, R., Larocca, L. M., Maggiano, N., Capelli, A., Scambia, G., Piantelli, M., 1992. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, **50** (3): 486-492.
- Rayman, M. P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, **64** (4): 527-542.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, **26** (9-10): 1231-1237.
- Rebman, J. P., Simpson, M. G., 2006. Checklist of the vascular plants of San Diego County. San Diego, CA: San Diego *Natural History Museum*.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., Lu, Y., Wang, Z., 2001. Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, **23** (8): 427-432.
- Rice-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, G. G., Davies, K. J., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *In Biochemical Society Symposia* **61**: 1-31.
- Rice-Evans, C., Rice-Evans, C. A., Bruckdorfer, K. R., 1995. Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Princeton University Press*.

- Riemersma, R. A., Rice-Evans, C. A., Tyrrell, R. M., Clifford, M. N., Lean, M. E. J., 2001. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Qjm*, **94** (5): 277-282.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K., 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51** (3): 571-581.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*, **10**: 1-29.
- Scambia, G., Ranelletti, F. O., Panici, P. B., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Mancuso, S., 1990. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. *British journal of cancer*, **62** (6): 942-946.
- Shi, Q. W., Su, X. H., Kiyota, H., 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in genus Euphorbia. *Chemical reviews*, **108** (10): 4295-4327.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, **16** (3): 144-158.
- Sisein, E. A., 2014. Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, **2** (2): 110-118.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., Knez, Ž., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, **89** (2): 191-198.
- Teofili, L., Pierelli, L., Iovino, M. S., Leone, G., Scambia, G., De Vincenzo, R., Larocca, L. M., 1992. The combination of quercetin and cytosine arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth. *Leukemia research*, **16** (5): 497-503.
- Ukwuani, AN., Abubakar, MG., Hassan, SW., Agaie, BM., 2012. Grewia crenata'nın hidrometanol yaprak özütünün toksikolojik çalışmaları. *Int J Eczacılık Bilim İlaç Res*, **4** (4): 245-249.
- Üstündaş, M., Yener, H. B., Helvacı, Ş. Ş., 2018. Parameters Affecting Lycopene Extraction From Tomato Powder and Its Antioxidant Activity. *Anadolu University of Sciences & Technology-A: Applied Sciences & Engineering*, **19** (2).
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39** (1): 44-84.
- Wang, Y. H., Chao, P. D. L., Hsiu, S. L., Wen, K. C., Hou, Y. C., 2004. Lethal quercetin-digoxin interaction in pigs. *Life Sciences*, **74** (10): 1191-1197.
- Webster, G. L., 1994. Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 3-32.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Aoike, A., 1990. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS letters*, **260** (1): 10-13.
- Yoshida, M., Yamamoto, M., Nikaido, T., 1992. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Research*, **52** (23): 6676-6681.
- Yuet Ping, K., Darah, I., Chen, Y., Sreeramanan, S., Sasidharan, S., 2013. Acute and subchronic toxicity study of Euphorbia hirta L. methanol extract in rats. *BioMed research international*.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, **64** (4): 555-559.





## ÖZ GEÇMİŞ

Eğitim hayatımda ilköğretimimi Yalınağaç İlkokulu'nda, ortaöğretimimi Mahir Kolyiğit Ortaokulu'nda, Lise öğrenimimi Ahmed-I Hani Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2015 yılında üniversite hayatına Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü kazanarak başladım. 2019 yılında mezun oldum ve hemen ardından yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans eğitimimi tamamlayarak 2022 yılında mezun oldum.





**VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU**

**Tarih:** 17/08 /2022

Tez Başlığı / Konusu: *Euphorbia macroclada* (Sütleğen) BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 46 sayfalık kısmına ilişkin, 17/08/2022 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 (yüzde sekiz) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Materyal ve yöntem hariç,
- Kaynaklar hariç,
- Tezden çıkan yayımlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Oktay ŞAYAK

Öğrenci No: 19910001208

Anabilim Dalı: MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM

Programı: MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM

Statüsü:  Yüksek Lisans  Doktora

**DANIŞMAN ONAYI**  
**UYGUNDUR**

**ENSTİTÜ ONAY**  
**UYGUNDUR**

Dr. Öğr. Üyesi Deniz İrtem KARTAL