

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ANKARA’NIN ETRAFINDAN TOPLANAN BİTKİLERİN
ANTİOKSİDAN VE ANTİKANSER DEĞERLENDİRİLMESİ**

Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM

04.07.2014

ÖZET

Doktora Tezi

ANKARA’NIN ETRAFINDAN TOPLANAN BİTKİLERİN ANTİOKSİDAN VE ANTİKANSER DEĞERLENDİRİLMESİ

Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Bitkilerin ve bitkilerden elde edilen bileşiklerin ilaç olarak kullanımı uzun zamanlardan beri bilinmektedir. Bu bileşikler diyabetten çeşitli kanser tiplerinin tedavisine kadar birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde klinik olarak etkili ilaçların çoğu, tıp tarihinin bitkisel kaynaklı atalarından gelişmiştir. Bu çalışmanın amacı, Ankara yöresinden toplanan *Centaurea virgata* Lam., *Cichorium intybus* L., *Euphorbia macroclada* Boiss., *Melilotus officinalis* (L.) Pall. ve *Zygophyllum fabago* L. bitki türlerinin farklı kısımlarından elde edilen metanol özütlерinin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser aktivitelerinin yanısıra, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriklerini belirlemektir. Türlerin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı tayinleri Folin-Ciocalteu ve Alüminyum Klorür Kolorimetrik metoduyla yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini ise Disk Difüzyon yöntemi ile 5 farklı mikroorganizma (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Candida albicans* ATCC-10231) kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra, bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen metanol özütlерinin etkisi antioksidan savunma sisteminde yer alan katalaz (KAT), glutatyon-S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve lipit peroksidasyon üzerinde incelenmiştir. Ayrıca bitki özütleri, HL-60 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarına XTT testi uygulanarak hücre canlılıklarına etkileri belirlenmiştir. Toplam fenolik bileşik içeriği bakımından *E. macroclada*’nın yaprak ve çiçeğinden elde edilen metanol özütleri 573.10 ve 143.64 mg GAE/L değerleri ile diğer bitki örneklerine göre en zengin bitki olduğu görülmüştür. *E. macroclada* ve *Z. fabago* yaprağından elde edilen özütlерin sırasıyla 450.70 ve 181.47 mg QE/L değerleri ile flavonoid içeriği bakımından en zengin bitki oldukları gösterilmiştir. Disk Difüzyon yönteminden elde edilen sonuçlara göre, *C. virgata* çiçeğinden hazırlanan metanol özütü tüm bakteri suşlarının üremesini yüksek düzeyde inhibe etmiştir. Ayrıca, *S. aureus* üremesi tüm bitki özütleri tarafından inhibe edilmiştir. Ancak, *C. albicans* suşuna karşı hiçbir bitki özütü etkili olamamış, inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Tez çalışmasında, *Z. fabago* meyvesinden ve *C. intybus* çiçeğinden elde edilen özütlер anlamlı bir şekilde GST enziminin aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, *C. intybus* çiçeğinden elde edilen metanol özütünün diğer bitki özütlерine göre, GPx enziminin inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, *E. macroclada* yaprağı metanol özütünün iyi derecede KAT enzimini inhibe ettiği görülmüştür. SOD enzim çalışmasında *E. macroclada* çiçeğinden hazırlanan özüt diğer bitki örneklerine göre SOD enziminin aktivitesini inhibe etmiştir. *C. virgata* ve *M. officinalis* çiçeğinden hazırlanan metanol özütleri ise KAT ve SOD enzimleri üzerinde hiçbir inhibisyon etki göstermemiştir. Daha sonra bitki özütlерinin, HL-60 lösemi hücre modeli ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarına XTT yöntemi uygulanarak hücre canlılıklarına olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *C. intybus*’un çiçeğinden ve *E. macroclada*’nın yaprağından hazırlanan metanollu özütlерin HL-60 hücrelerin büyümesini %69 ve %65 oranında azalttığını göstermiştir. IC₅₀ değerleri ise 0.002 ve 0.027 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ancak, elde edilen bitki özütlерin hiç birisi MCF-7 hücre büyümesi üzerinde olan sitotoksikite etkisi görünmemiştir.

Temmuz 2014, 117 sayfa

Anahtar Kelimeler : Antioksidan savunma, ksenobiyotik detoksifikasyonu, lösemi, meme kanseri, antimikrobiyal aktivite, tıbbi bitkiler

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTICANCER ACTIVITIES OF THE MEDICINAL PLANTS COLLECTED FROM ANKARA PROVINCE

Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Plants and most of the plant derived compounds have long been known for their potential pharmaceutical effects. They play an important role on the treatment of several diseases from diabetes to various types of cancers. Recently, most of the clinically effective pharmaceuticals are developed from plant derived ancestors in the history of medicine. The aim of this study is to investigate the antioxidant, antimicrobial, anticancer activities and total phenolic and flavonoid contents of methanol extracts from different parts of *Centaurea virgata* Lam., *Cichorium intybus* L., *Euphorbia macroclada* Boiss., *Melilotus officinalis* (L.) Pall. and *Zygophyllum fabago* L. herb types which were collected from Ankara province. Total phenolic and flavonoid contents of the plant samples were assayed by Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride Colorimetric methods. The antimicrobial activity was determined by the Disc Diffusion method against five microbial species (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Candida albicans* ATCC-10231). There after, the methanol extracts prepared from different parts of these herbs were evaluated for their potential medicinal value in terms of biological targets which are participating in antioxidant defense such as catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and lipid peroxidation. Also, the methanolic plant extracts were applied on HL-60 and MCF-7 breast cancer cell strands by means of XTT test to determine their effects on the cell vitalities. The results indicated that the highest total phenolic contents of leaf and flower extracts were from *E. macroclada* with 573.10 and 143.64 mg GAE/L, respectively. The highest flavonoid contents were detected from the leaves of *E. macroclada* and *Z. fabago* with 450.70 and 181.47 mg QE/L, respectively. According to the results of the disc diffusion method, the flower extract of *C. virgata* was showed highly effective against all of the bacteria strains. Also, *S. aureus* was inhibited by all of the plant extracts while none of the samples didn't show any inhibition activity against *C. albicans*. The evaluation of extracts against biological targets revealed that the fruit extract of *Z. fabago* and the flowers of *C. intybus* show the inhibition against GST. The best inhibitor for GPx was determined as the flower extract of *C. intybus*. For CAT, the highest inhibition was observed with *E. macroclada* leaf extract. Among the extracts analyzed the only but slight SOD inhibition was determined with flower part *E. macroclada*. The extracts from *C. virgata* and *M. officinalis* did not show any CAT and SOD enzyme inhibitory activities. Then the plant extracts were applied on HL-60 leukemia and MCF-7 breast cancer cell lines by means of XTT assay to determine their effects on the cells vitalities. According to the results, the methanolic extracts of *C. intybus* flowers and *E. macroclada* leaves inhibited the growth of HL-60 cell line by 69% and 65% with IC₅₀ values of 0.002 and 0.027 µg/mL, respectively. The results which obtained from XTT assay also showed that none of the plant extracts didn't show any cytotoxicity effects on the MCF-7 cell line.

July 2014, 117 pages

Key Words : Antioxidant defense, xenobiotic detoxification, leukemia, breast cancer, antimicrobial activity, medicinal plants

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında sabır ve hoşgönülle bana destek olan, bilgilerini bana esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)

Laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren, bana engin fikirler ve tecrübelerini sunan saygı değer Doç. Dr. Yasemin G. İŞGÖR (Ankara Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu) ve saygı değer Yrd. Doç. Dr. S. Belgin İŞGÖR'e, (Atılım Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Uygulamalı Kimya Bölümü)

Doğduğum günden beri hayatta kendime bir yer açıp kendi ayaklarımın üzerinde ilerleyebilmem ve her insanın özünde tek amacı olan mutlu bir yaşama benim de sahip olmam için maddi ve manevi her türlü fedakarlığı gösterip destek olan sevgili annem Nooshin MOHAMMADIAN'a, babam Mehrdad SHOMALI MOGHADDAM'e, kardeşim Kianoosh SHOMALI MOGHADDAM'e ve sevgili eşi Sharareh BASTANI'ye

Hayatıma sevgisi ve aşkıyla renk katan Shahram ABBASNEJAD'a

Tez çalışmamın başından sonuna kadar hep yanımda olan ve bana destek veren sevgili Şüheda KOÇ'a

Suyunu içtiğim ve ekmeğini yediğim Türkiye Cumhuriyeti'ne,

Laboratuvar ortamında benimle yan yana çalışan, içirimde her birisinin güzel hatıraları olan sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve bana yalnızlığı hiç hissettirmeyen bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM

Ankara, Temmuz 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Tez Çalışma Kapsamında İncelenen Bitki Örneklerinin Sistematik ve Biyolojik Özellikleri	3
2.1.1 <i>Centaurea virgata</i> (Lam.)	3
2.1.2 <i>Cichorium intybus</i> L.	4
2.1.3 <i>Euphorbia macroclada</i> (Boiss.)	5
2.1.4 <i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	7
2.1.5 <i>Zygophyllum fabago</i> (L.)	8
2.2 İkincil Bitki Metabolitleri.....	8
2.2.1 Alkaloidler	9
2.2.2 Fenolik bileşikler	10
2.3 Serbest Radikaller	13
2.3.1 Serbest radikallerin tanımı.....	13
2.3.2 Serbest radikallerin oluşumu	15
2.3.3 Serbest radikallerin sınıflandırılması.....	16
2.4 Lipit Peroksidasyonu	16
2.5 Antioksidan Savunma Sistemi	17
2.5.1 Enzimatik antioksidanlar	19
2.5.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD).....	19
2.5.1.2 Katalaz (KAT)	20
2.5.1.3 Glutasyon peroksidaz (GPx).....	21
2.5.1.4 Glutasyon-S-transferaz (GST)	22
2.5.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar	24
2.6 Kansere Genel Bakış	26
2.6.1 Meme kanseri	27
2.6.2 İnsan akut promiyelositik lösemi.....	27
2.7 Mikroorganizmalar	28
2.7.1 <i>Bacillus subtilis</i>	28
2.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.7.3 <i>Escherichia coli</i>	29
2.7.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.7.5 <i>Candida albicans</i>	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal	30
3.2 Yöntem	33
3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması, saklanması ve tür tespiti	33

3.2.2 Ekstraksiyon öncesi bitki örneklerinin hazırlanması	33
3.2.3 Bitki örneklerinin ekstraksiyona hazırlanması	34
3.2.4 Bitki özütlerinin antimikrobiyal analizi.....	34
3.2.4.1 Mikroorganizmaların üremesi için besi yerlerinin hazırlanması.....	35
3.2.4.2 Bitki özütlerin disklere emdirilmesi	35
3.2.4.3 Mikroorganizmaların standardize edilmesi	35
3.2.4.4 Besi yerlerin inokülasyonu ve disklerin yerleştirilmesi	37
3.2.4.5 İnhibisyon zonların ölçümü.....	37
3.2.4.6 Antimikrobiyal analizde kullanılan negatif ve pozitif kontrol.....	37
3.2.5 Bitki özütlerin Lowry metodu ile protein tayini	38
3.2.6 Bitki özütlerin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.	38
3.2.7 Bitki özütlerinin toplam flavanoid madde miktarının belirlenmesi.....	39
3.2.8 Toplam polifenol miktarına bağlı olarak bitki özütlerin doz plaka hazırlanması	39
3.2.9 Sığır karaciğerden homojenat hazırlanması	40
3.2.10 Bitki özütlerinin glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	40
3.2.11 Bitki özütlerinin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	41
3.2.12 Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	42
3.2.13 Bitki özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	43
3.2.14 Bitki özütlerinin TBARS yöntemi ile lipid peroksidasyonu üzerinde etkilerinin analizi	44
3.2.15 Bitki özütlerin insan hücre serilerinin üzerinde olan etkileri	45
3.2.15.1 İnsan hücre serilerinin canlılığının sürdürülmesi.....	45
3.2.15.2 Tripan mavi metodu ile kanser hücrelerin sayımı	46
3.2.15.3 XTT Metodu ile özütlerin kanser hücresi üzerine olan sitotoksik etkilerinin analizi	46
4. BULGULAR	48
4.1 Bitki Özütlerin Verimleri	48
4.2 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	48
4.2.1 Disk difüzyon yöntemi ile pozitif ve negatif kontrollerin sonuçları	48
4.2.2 Bitki özütlerinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları	49
4.3 Bitki Özütlerin Toplam Protein Tayini.....	51
4.3.1 Kalibrasyon eğrisi	51
4.3.2 Bitki özütlerinin protein miktarı	51
4.4 Bitkilerin Toplam Fenolik Madde Tayini.....	52
4.4.1 Kalibrasyon Eğrisi	52
4.4.2 Bitkilerin toplam fenolik madde miktarı	53
4.5 Bitki Özütlerinin Toplam Flavonoid Madde Tayini.....	54
4.5.1 Kalibrasyon eğrisi	54
4.5.2 Bitkilerin toplam flavonoid madde miktarı	54
4.6 Bitki Özütlerinin Glutatyon-S-Transferaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri	55
4.7 Bitki Özütlerinin Glutatyon Peroksidaz Enzimi Üzerine Olan Etkileri	60
4.8 Bitki Özütlerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri	65
4.9 Bitki Özütlerinin Superoksit Dismutaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri.....	71

4.10 Bitki Özütlerrinin Lipit Peroksidasyon Üzerinde Olan Etkileri	76
4.11 XTT Metodu ile Özütlerrin Kanser Hücresi Üzerine Olan Sitotoksik Etkileri	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
KAYNAKLAR	101
EKLER.....	113
EK 1 <i>Centaurea virgata</i> Lam. ‘nın Türkiye deki yayılış alanları.....	113
EK 2 <i>Cichorium intybus</i> L.’ un Türkiye’deki yayılış alanları.....	114
EK 3 <i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.’nın Türkiye’deki yayılış alanları.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	116

SİMGELER DİZİNİ

ALA	Alfa-lipoik asit
AlCl ₃	Alüminyum klorür
4-AP	4-aminoantipirin
ATCC	American Type Culture Collection
BaCl ₂	Baryum klorür
BHT	Butil Hidroksi Toluen
BRCA1	Breast Cancer Susceptibility Gene 1
BRCA2	Breast Cancer Susceptibility Gene 2
BSA	Sığır Serum Albumin
CCl ₄	Karbon tetraklorit
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
ClO ⁻	Hipoklorit anyonu
CN ⁻	Siyanid
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat
°C	Celsius derece
Cu	Bakır
Cys	Sistein
dH ₂ O	Distile Su
EtOH	Etanol
F ⁻	Fluoride
HCl	Hidro klorür asit
HL-60	İnsan akut promiyelositik lösemi
HOCl	Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HRO ₂	Hidroperoksil radikali
IC ₅₀	Inhibitory Concentration
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum di fosfat
K ₂ HPO ₄	Potasyum mono fosfat
L [•]	Lipit radikalının
LH	Doymamış yağ asiti
MCF-7	Meme kanseri
MDA	Malondialdehit
MDA-MB-468	Meme kanseri hücre hattı
MEA	Malt Extract Agar
MeOH	Metanol
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mn	Manganez

NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaN ₃	Sodyum azit
NaOH	Sodyum hidroksit
NCI-H460	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
nm	Nano metre
N	Normalite
N ₃ ⁻	Azit
NO ⁻	Nitrikoksit
NO ₂ ⁻	Nitrojen dioksit
OH	Hidroksil
ONOO ⁻	Peroksinitrit
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
RO ₂ ⁻	Peroksil radikali
RONOO	Alkil peroksinirat
SGC-7901	Gastrik karsinoma hücre hattı
SW480	Kolorektal kanser hücre hattında
t-BOOH	Tert-butil hidroperoksit
X [•]	Serbest radikal bileşiği
Zn	Çinko

Kısaltmalar

DHBS	Sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat
DHLA	Dihidrolipoik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTT	Ditiyoteritol
EC	Enzyme Commission number
EDTA	Etilenediaminetetraasetik asit
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
GA	Gallik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redüklenmiş glutasyon
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon-S- transferaz
HRP	Horse Raddish Peroksidaz
KAT	Katalaz
kDa	Kilo Dalton
MIC	Minimum Inhibition Concentration
M.Ö	Milattan önce
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromit
NA	Nurient Agar
NADPH	Nikotinamidadenin dinükleotit fosfat

NB	Nutrient Broth
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	Optical Density
PBS	Salin-fosfat tamponu
RNT	Reaktif Nitrojen Türevleri
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asetik asit
TCA	Trikloro asetik asit
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
vb.	Ve benzeri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XOD	Ksantin oksidaz
XTT	2,3-bis (2-Metoksi-4-nitro-5-sülfofenil-2-tetrazolium-5-Karboksianilid) tüzü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Centaurea virgata</i> Lam.....	3
Şekil 2.2 <i>Cichorium intybus</i> L.	5
Şekil 2.3 <i>Euphorbia macroclada</i> (Boiss.).....	6
Şekil 2.4 <i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	7
Şekil 2.5 <i>Zygophyllum fabago</i> (L.)	8
Şekil 2.6 Kodein, Vinblastin, Vinkristin, Kolşisin	10
Şekil 2.7 Gallik asit ,Kafeik asit.....	11
Şekil 2.8 Kuersetin, Kaempferol, Naringenin.....	12
Şekil 2.9 Doymamış yağ asitlerin peroksidasyonu	17
Şekil 2.10 Enzimatik antioksidan savunma sistemi	23
Şekil 3.1 Bakteri süspansiyonu ile McFarland standardını karşılaştırmak için kullanılmış kağıt.....	36
Şekil 4.1 Toplam protein tayini için BSA standart eğrisi grafiği.....	51
Şekil 4.2 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart eğrisi grafiği	53
Şekil 4.3 Toplam flavonoid madde tayini için kuersetin standart eğrisi grafiği	54
Şekil 4.4 GST enzim aktivite eğrisi	55
Şekil 4.5 <i>C. virgata</i> Lam. bitki çiçeği özütünün glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	56
Şekil 4.6 <i>C. intybus</i> L. bitki çiçeği özütünün glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	57
Şekil 4.7 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	57
Şekil 4.8 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki yaprağı özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	58
Şekil 4.9 <i>M. officinalis</i> (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	58
Şekil 4.10 <i>Z. fabago</i> L. bitki meyvesi özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	59
Şekil 4.11 <i>Z. fabago</i> L. bitki yaprağı özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	59
Şekil 4.12 Bitki özütlerinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	60
Şekil 4.13 GPx enzim aktivite eğrisi.....	61
Şekil 4.14 <i>C. virgata</i> Lam. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	61

Şekil 4.15 <i>C. intybus</i> L. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	62
Şekil 4.16 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	63
Şekil 4.17 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki yaprağı özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	63
Şekil 4.18 <i>M. officinalis</i> (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	64
Şekil 4.19 <i>Z. fabago</i> L. bitki meyve özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	64
Şekil 4.20 <i>Z. fabago</i> L. bitki yaprağı özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	65
Şekil 4.21 Bitki özütlerinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	65
Şekil 4.22 H ₂ O ₂ kalibrasyon eğrisi.....	66
Şekil 4.23 <i>C. virgata</i> Lam. bitkisinin çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	67
Şekil 4.24 <i>C. intybus</i> L. bitkisi çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	67
Şekil 4.25 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitkisi çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	68
Şekil 4.26 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki yaprağı özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	68
Şekil 4.27 <i>M. officinalis</i> (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	69
Şekil 4.28 <i>Z. fabago</i> L. bitki meyve özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	69
Şekil 4.29 <i>Z. fabago</i> L. bitki yaprağı özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	70
Şekil 4.30 Bitki özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	70
Şekil 4.31 SOD enzim aktivite eğrisi.....	71
Şekil 4.32 <i>C. virgata</i> Lam. bitki çiçeği özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	72
Şekil 4.33 <i>C. intybus</i> L. bitki çiçeği özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	73
Şekil 4.34 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki çiçeği özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	73
Şekil 4.35 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki yaprağı özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	74

Şekil 4.36 <i>M. officinalis</i> (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	74
Şekil 4.37 <i>Z.fabago</i> L. bitki meyvesi özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	75
Şekil 4.38 <i>Z.fabago</i> L. bitki yaprağı özütünün süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	75
Şekil 4.39 Bitki özütlerinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.	76
Şekil 4.40 MDA kalibrasyon eğrisi.....	77
Şekil 4.41 <i>C. virgata</i> Lam. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	77
Şekil 4.42 <i>C. intybus</i> L. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	78
Şekil 4.43 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	78
Şekil 4.44 <i>E. macroclada</i> Boiss. bitki yaprağı özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	79
Şekil 4.45 <i>M. officinalis</i> (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	79
Şekil 4.46 <i>Z. fabago</i> L. bitki meyvesi özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	80
Şekil 4.47 <i>Z. fabago</i> L. bitki yaprağı özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	80
Şekil 4.48 Bitki özütlerinin lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi	81
Şekil 4.49 XTT metodunda gerçekleştirilen absorban değişimi.....	82
Şekil 4.50 Bitki özütlerinin HL-60 hücre hattı üzerinde olan etkisi	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Serbest radikallerin kaynakları	14
Çizelge 2.2 Biyolojik sistemlerde bulunan antioksidan savunma sistemi	18
Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan bitki örnekleri.....	30
Çizelge 3.2 Bitkilerin toplandığı lokasyonlar	31
Çizelge 3.3 Bitki örneklerine verilen etiket numaraları	33
Çizelge 3.4 Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin listesi	37
Çizelge 4.1 Bitki özütlerin (%) verimleri.....	48
Çizelge 4.2 Bitki özütlerin antimikrobiyal aktivite sonuçları	50
Çizelge 4.3 Bitki özütlerinin toplam protein miktarı	52
Çizelge 4.4 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarı.....	53
Çizelge 4.5 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı.....	55

1. GİRİŞ

Bitkiler sahip oldukları kompleks kimyasal yapılardan dolayı yüz yıllardır insanlar tarafından geleneksel tedavinin temelini oluşturmaktadır. Yer yüzünde 750.000 ile 1.000.000 arasında bitki türünün olduğu tahmin edilmektedir (Baytop 1999). Bu rakamın yaklaşık %1-10'u insanlar tarafından besin ve tıbbi amaçta kullanılmaktadır.

Bitkilerin tıbbi kullanımları hakkında ilk yazılı kayıtlar Sümerler ve Akadlar tarafından 2600 (M.Ö) yılında yapılmıştır (Samuelsson 1999). 500 (M.Ö) yılında yazılan ve 700'ün üzerinde ilacın belgelendiği "Ebers Papirüs", Mısır'da bulunan en iyi ilaç kayıdır. Çin'de M.Ö 1100 yılından yazılan "Materia Medica"da 600'den fazla tıbbi bitkinin ismi kayıt altına alınmıştır (Cragg vd. 1997). Yunanlılar da bitkisel ilaçların gelişiminde önemli katkıda bulunmuşlardır. Yunanlı hekim Dioscorides "De Materia Medica" adlı eserinde 600'den fazla tıbbi bitkiden bahsetmiştir (Shoeb 2006).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya nüfusunun yaklaşık %80'nin, tedavinin ilk basamağında geleneksel tıptan yardım aldığını tahmin etmektedir (Shoeb 2006). Günümüzde modern ilaçların yaklaşık %50'den fazlasının doğal ürün kökenli olması, bu durumun ne kadar etkin bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. Türkiye'nin üç tarafının denizlerle çevrili olması farklı özellikte iklim tiplerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu farklı iklim, zengin bir bitki florasının oluşumuna neden olmaktadır. Bugün, Türkiye florasında yaklaşık 10.500'ün üzerinde bitki türü bulunmaktadır. Bu rakamın %30'unu endemik türler oluşturmaktadır (Güner vd. 2000). Bu bitkilerin yaklaşık 1000 türü ilaç ve baharat olarak kullanılmaktadır, bununla birlikte bir çoğunun tıbbi özellikleri keşfedilmemiştir. Türkiye'de tıbbi bitkiler, çoğunlukla; *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Resedaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Zygophyllaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae* ve *Euphorbiaceae* ailelerinde yer almaktadır (Çakılcıoğlu ve Türkoğlu 2010).

Yukarıda kısaca basettiğimiz bilgilerden faydalanarak, bu tez kapsamında *Centaurea virgata*'nın çiçeği (*Asteraceae*), *Cichorium intybus*'un çiçeği (*Asteraceae*), *Melilotus officinalis*'in çiçeği (*Fabaceae*), *Zygophyllum fabago*'nun yaprağı ve meyvesi

(*Zygophyllaceae*) ve *Euphorbia macroclada*'nın çiçeği ve yaprağının (*Euphorbiaceae*) antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser özellikleri incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Tez Çalışma Kapsamında İncelenen Bitki Örneklerinin Sistematik ve Biyolojik Özellikleri

2.1.1 *Centaurea virgata* Lam.

Centaurea virgata Lam., Asteraceae familyasına ve *Centaurea* cinsine ait olan ve çok yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.1). Halk arasında peygamber çiçeği olarak tanınan *C. virgata*, genel olarak Bulgaristan, Lübnan, Transkafkasya, Kuzey Irak, Afganistan ve Türkistan'da dağılım göstermektedir. Türkiye'de ise İç Anadolu, Kuzey Batı Anadolu ve Doğu Anadolu'da bulunmaktadır (EK 1) (www.turkherb.ibu.edu.tr). *Centaurea* cinsinde yer alan bazı bitki türleri halk arasında Peygamber çiçeği, Zerdali diken, Çoban kaldıran, Acı süpürge ve Timur diken gibi isimler ile tanınmaktadır (Arif vd. 2006, Çakılcıoğlu ve Türkoğlu 2010).



Şekil 2.1 *Centaurea virgata* Lam. (<http://www.ozgurdogan.net>)

Asteraceae ailesinde bulunan bitkilerin bir çoğu tıbbi ve biyolojik aktiviteye sahiptir. *Centaurea* cinsinde yer alan birçok bitki türünün yıllardan beri geleneksel tıpta çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanımı belgelenmiştir (Khammar ve Djeddi 2012). Bu cinste yer alan bir çok bitki türü halk arasında antidiyabetik, antidiyaretik,

antiromatizmal, antienflamatuvar, diüretik, adet söktürücü, hipotensif, sitotoksik ve antibakteriyal olarak kullanılmaktadır (Arif vd. 2006).

Batı ve Güney Batı Anadolu’da yayılış gösteren *C. cyanus* türünün kuru çiçekleri halk arasında ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır (Arif vd. 2006).

Doğu Anadolu’da yetişen *C. behen*, Akbehmen ve Zerdali dikenini olarak bilinmekte ve çiçekleri mide rahatsızlıklarında ve adet söktürücü olarak kullanılmaktadır. Kuzey Batı Anadolu’da yetişen ve çoban kaldıran adıyla bilinen *C. calcitrapa*’nın ateş düşürücü etkisi ispatlanmıştır (Baytop 1999).

Çin’de *C. uniflora* geleneksel tıpta; ateşi düşürmede ve zehirlenmelerde kullanılmaktadır. Ayrıca, bitkinin etilasetatlı özütünün membran lipid peroksidasyonunu engellediği belirlenmiş ve antiaterosklerotik etkileri gösterilmiştir (Wei vd. 1997).

Macaristan’ın, Jakabszallas bölgesinde *C. sadleriana*’nın toprak üstü kısımları hayvanlarda (özellikle koyunlarda) yara iyileşme tedavilerinde kullanılmaktadır (Csupor vd. 2010).

Tez kapsamında incelenen *C. virgata* geleneksel tıpta antialerjik ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Yeşilada 2002, Çakılcıoğlu ve Türkoğlu 2010).

2.1.2 *Cichorium intybus* L.

Cichorium intybus L., Asteraceae ailesine ve *Cichorium* cinsinde yer alan çok yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.2). Halk arasında; Türkiye’de Beyaz Hindiba, Avrupa’da Chicory, İran ve Hindistan’da Kasni adıyla tanınmaktadır. *C. intybus*, genellikle Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise yaklaşık olarak hemen her bölgede bulunmaktadır (EK 2) (www.turkherb.ibu.edu.tr).



Şekil 2.2 *Cichorium intybus* L. (www.sifalioylar.org)

C. intybus, tıbbi araştırmalarda ve halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin kökü; antihepatotoksik, antiölserojenik, antienflamatuvar, iştah açıcı ve ateş düşürücü gibi etkiye sahiptir (Nandagopal ve Kumari 2007). *C. intybus* ayrıca baş ağrısı, hepatomegali, iltihaplanma, iştahsızlık, hazımsızlık, gut, cilt alerjisi, astım, kolik, sarılık ve farenjit gibi hastalıkların tedavisinde veya bu hastalıkların önlenmesinde kullanılmaktadır (Rastogi ve Mehrotra 1994). Yapılan araştırmalara göre bu bitkinin ilerki yıllarda AIDS, kanser ve diyabet gibi insan hayatını tehdit eden hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğinden söz edilmektedir (Angelina vd. 1999, Hazra vd. 2002). Ayrıca, bitkinin yumrulu kökleri inülin, seskiterpen laktonları, kumarinler, flavonoidler ve çeşitli vitaminleri içermektedir (Varotto vd. 2000).

2.1.3 *Euphorbia macroclada* Boiss.

Halk arasında Sütleğen olarak tanınan *Euphorbia macroclada*, Euphorbiaceae ailesinde ve *Euphorbia* cinsinde yer alan ve çok yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.3). Dünya’da genel olarak; Batı Suriye, Suriye çölü, Kuzey Irak, Kuzey Batı, Batı ve Orta İran ile Ermenistan’da yayılış göstermektedir. Türkiye’de ise İç ve Güney Anadolu’da bulunmaktadır (EK 3) (www.turkherb.ibu.edu.tr).



Şekil 2.3 *Euphorbia macroclada* Boiss. (www.sifaliothlar.org)

Dünya çapında, *Euphorbia* cinsinde yer alan bir çok bitki türünün geleneksel tıpta; cilt hastalıklarının tedavisinde, yaralarda, migrende, kurt düşürücü amaçla ve siğillerin tedavisinde kullanılmaktadır. Türkiye’de ise bazı *Euphorbia* türleri farklı bölgelerde cilt hastalıklarının tedavisinde ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Singla ve Pathak 1990, Özbilgin ve Saltan çitoğlu 2012).

Türkiye’de *E. macroclada*’nın lateksi genel olarak antimalarya, antihemoroidal, siğil tedavisinde, yara iyileştirmesinde, yılan ve akrep sokmasında, diş ağrısında, egzema tedavisinde ve mantar enfeksiyon tedavisinde kullanılmaktadır (Oral 2007, Yeşil 2007, Altundağ vd. 2011).

Geleneksel tıpta, *Euphorbia* cinsinde yer alan türlerin kökleri, tohumları, lateksi, gövdenin odun ve kabukları, yaprakları ve bazen de bitkinin tamamı kullanılmaktadır. *Euphorbia* türlerinin tedavi edici özellikleri onların çeşitli ikincil metabolitlere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Jatrofonlar, latiranlar, tigliyanlar, ingenanlar, mirsinanlar gibi iskeletlere sahip diterpenoidler *Euphorbia* türlerinin ana etken madde grubudur (Özbilgin ve Saltançitoğlu 2012). Ayrıca *Euphorbia* türleri seskiterpenler, diterpenler, triterpenler, flavonoidler, steroidler ve uçucu yağlar gibi önemli ikincil metabolitleri yüksek miktarda içermektedir (Jassabi 2006, Tang vd. 2012).

2.1.4 *Melilotus officinalis* (L.) Pall.

Melilotus officinalis, ya da halk arasında tanınan "Sarı yonca ve Eşek yoncası" *Fabaceae* ailesi ve *Melilotus* cinsine ait olan tek yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.4). Genel olarak dünya çapında Avrasya bölgesinde yayılış göstermektedir. Ayrıca, bu bitki habitat olarak Türkiye'nin tüm bölgelerinde bulunmaktadır (www.turkherb.ibu.edu.tr).



Şekil 2.4 *Melilotus officinalis* (L.) Pall. (<http://en.wikipedia.org>)

Melilotus cinsine ait olan bir çok bitki türünün geleneksel tıpta spazm, karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve idrar giderici olarak kullanılmaktadır. Taze *melilotus* bitkileri yüksek miktarda glikozid bileşiklerini, özellikle de melilotozid bileşiğini içermektedir (Dweck 2009).

M. officinalis, *Melilotus* cinsine ait olan şifalı bitkilerden birisidir. Halk arasında "Sarı yonca" olarak adlandırılmakta olup, ödem, varis ve yara tedavilerinde kullanılmaktadır (Çakılcıoğlu ve Türkoğlu 2010).

Fitokimyasal araştırmalara göre; *M. officinalis* yüksek miktarda kumarin, flavonoid, uçucu yağ, reçin ve tanninler gibi bileşikler içermektedir (Pleşca – Manea vd. 2002).

2.1.5 *Zygophyllum fabago* L.

Zygophyllaceae familyasında ve *Zygophyllum* cinsine ait olan çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.5). Halk arasında “Frenk kimyonu, Yabani kimyon, Balduz, Helmél, Karaman kimyonu” isimleri ile tanınmaktadır. Genel olarak, Suriye çölü, Ermenistan ve Kafkasya’da dağılım gösterirken, Türkiye’de ise Doğu ve Güney Anadolu’da yayılış göstermektedir (www.turkherb.ibu.edu.tr).



Şekil 2.5 *Zygophyllum fabago* L. (www.henriettesherbal.com)

Tareen ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, romatizma ve gut hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçların sentezinde *Z. fabago* kullanıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada *Z. Fabago*’nun merhem (lapa) olarak, cilt hastalıklarının, septik ve yaralanmaların tedavisinde kullanımı ifade edilmişlerdir.

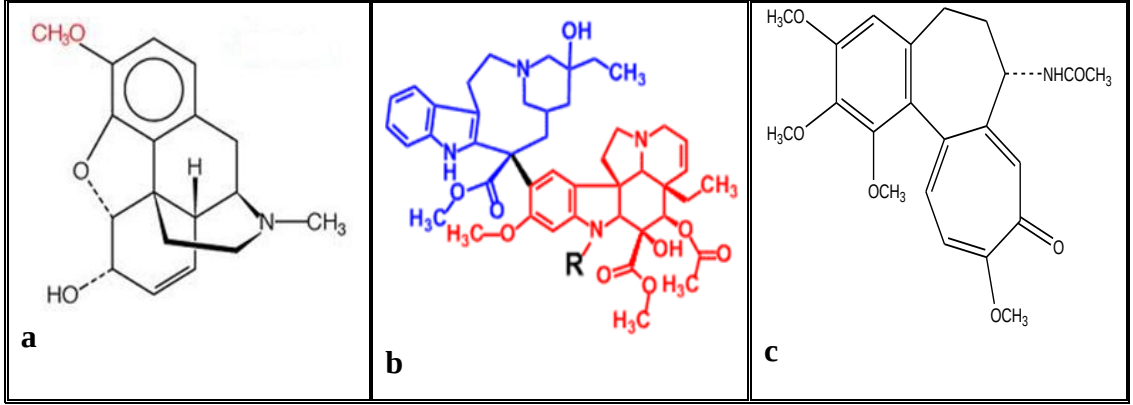
2.2 İkincil Bitki Metabolitleri

Doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Bu bileşiklerin bir kısmı bitkiler tarafından ikincil metabolit ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, mikroorganizmalara, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu rol oynamaktadır. Bu nedenle “ikincil bitki metabolitleri” veya “fitokimyasallar” diye adlandırılmıştır (Huang vd. 2010). İkincil bitki metabolitleri; alkaloidler, fenolik

bileşikler, terpenoidler, uçucu yağlar, glikozitler ve polisakkaritler olarak sınıflandırılmıştır.

2.2.1 Alkaloidler

Alkaloidler heterosiklik bir yapıdan oluşmaktadır. Heterosiklik yapı; pirrolidin, piridin, piperidin, kuinolin, izokuinolin, indol, tropan, kuinolizidin ve purin gibi gruplarda sınıflandırılmaktadır. Şimdiye kadar yaklaşık 10.000 alkaloid türü tanımlanmıştır (Lovkova 1981). Alkaloidler bazı teorilere göre bitkilerde nitrojen metabolizmasının sonucunda oluşmaktadır. Bitkilerden izole edilen alkaloidler güçlü bir şekilde tıbbi etkiye sahip olup, bir çok önemli ilaçların sentezinde kullanılmaktadır. Örneğin; vinblastin ve vinkristin, Apocynaceae ailesine ait olan *Catharanthus roseus* türünden izole edilmiştir. Bu bileşikler antitümör etkiye sahip olup, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların önemli bir maddesi olarak tanınmaktadır (Gueritte ve Fahy 2005). Kodein, genelde *Papaver bractreatum* bitkisinden izole edilip, öksürük şuruplarının üretilmesinde kullanılmıştır (Jones ve Luchsinger 1986). Morfin ilk defa 1805 yılında, *Papaver somniferum* adlı bir bitki türünden izole edilmiş olup, analjezik etkiye sahiptir (Fessenden ve Fessenden 1982). Kokain çeşitli tıbbi etkilere sahiptir ve anesteziye kullanılmaktadır. Ayrıca, morfinin Gram (+) ve Gram (-) bakteri suşlarının üzerine olan antimikrobiyal etkisi ispatlanmıştır (Omulokoli ve Chhabra 1997). Kokain *Erythroxylum coca*'dan izole edilmektedir. Kolşisin ise *Colchicum autumnale* türünden izole edilmekte olup, gut hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların önemli bir parçasıdır (Ebadi 2007). Şekil 2.6'da bazı önemli alkaloid bileşikler sunulmaktadır.



Şekil 2.6 a. Kodein, b. Vinblastin R=CH₃ Vinkristin R=CHO, c. Kolşisin (Chemdraw programı ile çizilmiştir)

2.2.2 Fenolik bileşikler

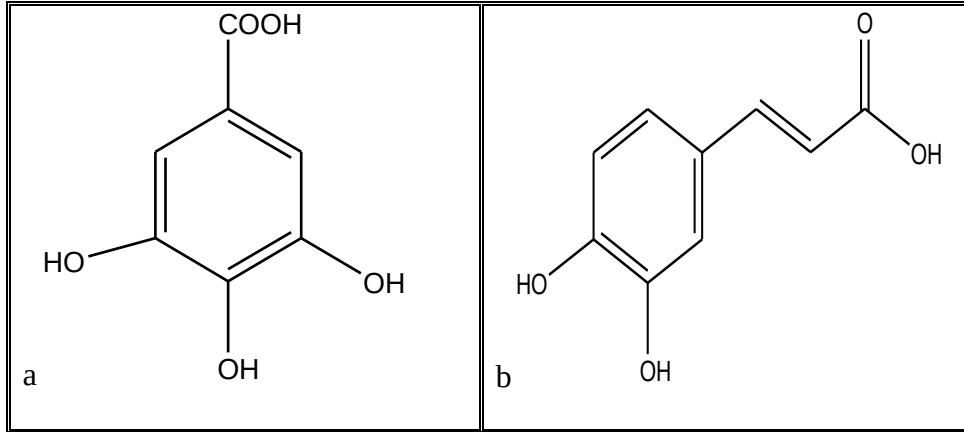
Fenolik bileşikler bir ya da daha fazla aromatik halka ve bir ya da daha fazla hidroksil (-OH) grubu içeren bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde en fazla bulunan ikincil metabolitler olarak, genellikle bitkilerin meyve, yaprak, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenmektedir (Wollgost ve Anklam 2000).

Bugüne kadar 8.000'den fazla fenolik bileşik ve türevleri tanınmaktadır. Bu bileşikler; fenolik asitler, flavanoidler, tanninler, stilbenler ve kurkuminoidler olarak sınıflandırılmaktadır (Fresco vd. 2006).

Fenolik asitler, fenolik bileşiklerin en önemli üyesi olarak, yapısal özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grupta yer alan bileşiklerin kimyasal yapılarında, hidroksi benzoik asit grubu bulunmaktadır. Gallik asit bu grubun önemli üyelerindendir. Gallik asit tıbbi bitkilerin kimyasal yapılarında yaygın olarak bulunmaktadır. Günlük diyetle kullanılan baharatlar örneğin, karanfil ve kekik yüksek miktarda gallik asit bileşiğini içermektedir (Cai vd. 2004, 2006, Shan vd. 2005, Surveswaran vd. 2007).

İkinci grubun üyeleri ise, hidroksi sinamik asit grubunu içermektedir. Kafeik asit ve kumarik asit bu grubun önemli bileşiklerindendir. Bu bileşikler, genel olarak tıbbi bitkilerde, baharatlarda, meyve ve sebzelerde bulunmaktadır (Cai vd. 2004). Kırmızı

meyveler örneğın; yaban mersini, böğürtlen, çilek, ahududu, kiraz ve kuşüzümü yüksek miktarda kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asit bileşiklerini içermektedir (Jakobek vd. 2007). Şekil 2.7’de gallik asit ve kafeik asit bileşiklerinin yapısı yer almaktadır.

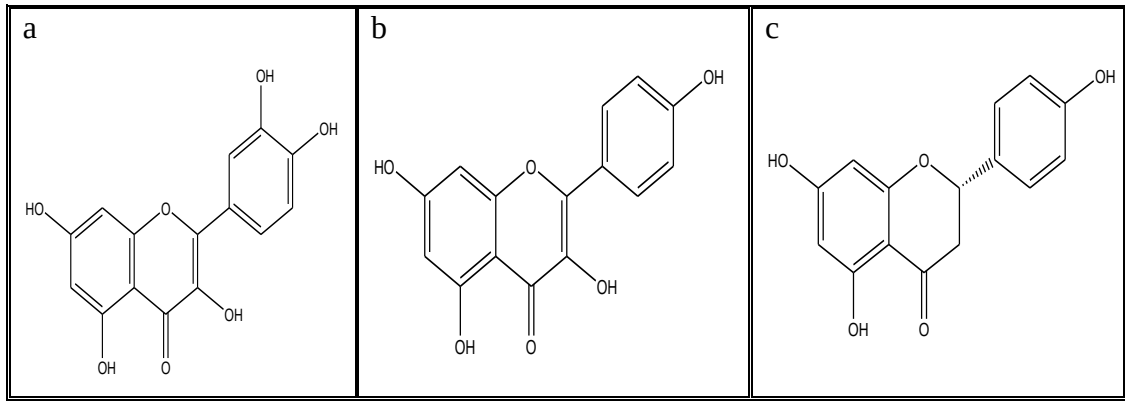


Şekil 2.7 a. Gallik asit, b. Kafeik asit (ChemDraw programı ile çizilmiştir)

Flavonoidler, çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkilerde tat, koku, ve renk gibi özelliklerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu bileşiklerin temel yapısı iki tane aromatik fenil benzo piren halkasından oluşmaktadır. Bu aromatik halkalar 3 karbon içeren bir zincir ile birbirleriyle bağlanmaktadır (Cai vd. 2004). Flavonoidler iskelet yapılarının farklı olmasından dolayı flavonlara, flavononlara, flavanonollara, flavanollara, antosiyaninlere, izoflavonoidlere ve biflavonoidlere ayrılmaktadır (Cai vd. 2004, 2006). Luteolin, apigenin, krisin flavonların en önemli bileşikleri olup, Asteraceae ve Lamiaceae familyasında yer alan bitkilerin yapılarında bulunmaktadır. Ayrıca flavonlar, maydanoz, kekik, kiraz, çay, zeytin ve brokolide yer almaktadır (Ren vd. 2003, Fresco vd. 2006). Kuersetin, kaempferol, mirisetin, morin ve galanin flavonol grubunda yer almaktadır. Flavonoller soğan, kiraz, elma, brokoli, lahana, patates, dut, çay, kırmızı şarap ve kimyonda bulunmaktadır. Ayrıca, flavonoller antikanser etki gösteren tıbbi bitkilerde örneğın; *Sophora japonica* ve *Rosa chinensis*’in çiçeklerinde ve *Crataegus pinnatifida*’nın meyvesinde bulunmaktadır (Cai vd. 2004, Shan vd. 2005). Flavanonlara örnek naringenin ve hespertin verilmektedir. Flavanonlar genel olarak üzümde sentezlenmektedir. Flavanollerin önemli üyelerinden kateçin ve epikateçin

olup, çay, elma, dut ve kokada bulunmaktadır (Cai vd. 2004, Shan vd. 2005). Siyanidin, delfinidin ve malvidin antosiyaninlerin önemli bileşiklerinden, zm, dut, kırmızı lahana ve mısırdan sentezlenmektedir (Cai vd. 2004, 2006).

Flavonoidler doğada genellikle serbest, glikozit ve bazen aglikonlar halinde bulunmaktadır (Hollman ve Katan 2000). Flavonoidler genellikle bir veya daha fazla çeker bileşiği ile –OH grubu veya karbon – karbon bağları ile bağlanıp, O – glikozitler ve C – glikozit bileşiklerini oluşturmaktadır (Cai vd. 2006, Fresco vd. 2006). şekil 2.8’de bazı önemli flavonoid bileşiklerin yapısı görülmektedir.



şekil 2.8 a. Kuersetin, b. Kaempferol, c. Naringenin (ChemDraw programı ile çizilmiştir)

Doğal olarak tannenler, suda nen ve 500 ile 4.000 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip olan polifenolik bileşiklerdir. Tannenler genellikle hidrolize (gallo ve ellagi) ve kondanse (proantosiyaninler) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Cai vd. 2004). Tannenler yaygın olarak alkaloidler, polisakkaritler ve proteinler ile kombine halde bulunmaktadır (Han vd. 2007). zmn ekirdeği ve kabuğu, am ağacının kabuğu yüksek miktarda tannen türevlerini içermektedir. Bundan dolayı kuvvetli antioksidan etkiye sahip olup, günümüzde kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Huh vd. 2004). Ayrıca, bir çok meyve (rneğin; elma, elik, ahududu, nar, ceviz, şeftali, zeytin ve erik), sebze (rneğin; nohut, mercimek ve kuru fasulye) ve baharat (rneğin; karanfil ve tarçın) yüksek miktarda tannen türevlerini içermektedir (Shan vd. 2005, Han vd. 2007).

Stilbenler, bir etan köprüsü ile bağlantı yapan iki tane aromatik halkadan oluşan fenolik bileşiklerdir (Fresco vd. 2006). *In vitro* ve *in vivo* ortamında yapılan çalışmalar, stilbenlerin hormona duyarlı tümörlerin tedavisinde etkili oldukları gösterilmiştir (Athar vd. 2007).

Kurkuminoidler, ferulik asit türevlerinden oluşan fenolik bileşiklerdir. Genellikle, Zingiberaceae familyasında yer alan bitkilerde bulunmaktadır. Zerdeçal ve hardal gibi baharatların sarı renkleri, kurkuminoid bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Cai vd. 2004).

2.3 Serbest Radikaller

2.3.1 Serbest radikallerin tanımı

Serbest radikaller, kararlı olmayan ve atomik yada moleküler yörüngesinde çiftleşmemiş bir veya birden fazla elektron bulunduran bir kimyasal ürün olarak tanınmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1999). Atomlardaki elektronlar yörünge veya orbital olarak bilinen boşluklarda hareket etmektedir. Bu kararsız bileşikler proteinler, lipitler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi makro moleküller ile reaksiyona girebilecek serbest enerji oluşturarak, biyolojik sistemlere zarar vermektedir. Bu bileşikler, genellikle oksijenli serbest radikaller olarak bilinen reaktif oksijen türleri (ROT) adıyla tanınmaktadır (Dröge 2002). Serbest radikaller, aerobik organizmalar tarafından yan ürünler olarak üretilip, oto katalitik reaksiyonları başlatarak diğer moleküllerin radikallere zincir reaksiyonlar ile dönüşümünü sağlamaktadır (Valko vd. 2007).

ROT (i) UV radyasyon, X- ışınları ve gama ışınlarından, (ii) metal katalizlenen tepkimeler sırasında, (iii) kirleticiler olarak atmosferden, (iv) enflamasyon sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından ve (v) mitokondriyel elektron transfer reaksiyonlarının ve diğer çeşitli mekanizmaların yan ürünleri olarak oluşmaktadır. ROT, hem endojen hem ekzojen olarak üretilip, üretim miktarı birçok faktör aracılığıyla belirlenmektedir. ROT'un endojen kaynakları arasında, mitokondriyel sistem, sitokrom

P₄₅₀ metabolizması, peroksizomlar ve iltihaplı hücre aktivasyonu yer almaktadır (Inoue vd. 2003).

Serbest radikal üretiminin en büyük kaynaklarından birisi mitokondridir. Mitokondrinin yapısında bulunan çeşitli antioksidanlar, ROT stresini azaltmakla görevlidir (Cadenans ve Davies 2000). Bunun dışında bazı enzimler de serbest radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Örneğin; hipoksantin, ksantine ve ksantin de ürik asite dönüşümünü katalizleyen ksantin oksidaz enzimi, bu aşamaların her birinde moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksiti, devamında da süperoksit anyonun oluşumunu sağlamaktadır (Borges vd. 2002, Vorbach vd. 2003).

Nötrofiller, eozinofiller, makrofajlar, mikrozomlar ve peroksizomlar da yukarıda bahsedilen endojen ROT kaynaklarına ek olarak verilebilmektedir (Valko vd. 2004).

Ayrıca ROT; ksenobiyotikler, klorlu bileşikler, çevresel faktörler, metaller ve iyonlar gibi dışsal konakçılar tarafından üretilmektedir (Çizelge 2.1) (Valko vd. 2006).

Çizelge 2.1 Serbest radikallerin kaynakları

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynakları
Mitokondriyal elektron taşıyıcı zincir	İyonize radyasyon
Endoplazmik retikulum ve çekirdek	Çevresel faktörler (hava kirliliği)
Redoks döngüsü	İlaçlar, ksenobiyotikler
Araşidonik asit metabolizması	Zararlı ışınlar (x-ray, U.V.)
Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar vs.) ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar	Ortamın havası (sigara dumanı, ozon, kükürtdioksit, egzoz gazları)
Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz vs. enzimler	Glutatyonu okside eden maddeler
Otooksidasyon reaksiyonları	

Tüm bu bilgilerin yanında, ROT'nin az miktarları bazı biyolojik durumlarda faydalı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin, hücre içi sinyal sisteminin bir takım fonksiyonlarında ve enfeksiyon ajanlara karşı savunma gibi hücresel tepkimelerde fizyolojik roller alabilmektedir (Poli vd. 2004).

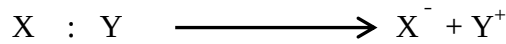
2.3.2 Serbest radikallerin oluşumu

Serbest radikaller hücre içinde metabolik olaylar sırasında pozitif ve negatif yüke sahip olarak, 3 temel mekanizmayla meydana gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge 2001).

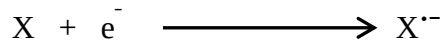
- 1) Kovalent bağ taşıyan bir molekülün homolitik yıkımı sonucu; yüksek enerji taşıyan elektromanyetik dalgalar veya yüksek sıcaklık derecesi, kimyasal bağların kırılmasına neden olmaktadır. Bağın yapısında bulunan iki elektron, bağın kırılması sonucunda, her bir elektron ayrı ayrı atomlar üzerinde olacak şekilde ayrılır. Dolayısıyla, bu tür kırılmaya homolitik kırılma adı verilmektedir (Altan vd. 2006).



- 2) Heterolitik bölünmede, kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün bölünmesi sonucunda kovalent bağı oluşturan atomlarından birinin elektronunun bir diğer atomuna geçmektedir (Altan vd. 2006).



- 3) Bu mekanizmada, normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile serbest radikal oluşmaktadır (Altan vd. 2006).



Serbest radikaller kendilerini kararlı hale getirmeye çalışırken, hücrelerdeki lipid, protein, DNA ve karbohidratlar ile reaksiyona girerek zincir reaksiyonlara yol açmaktadır. Bu reaksiyonlar, hücre bileşiklerinin bozulmasına, hücre fonksiyon kaybına ve sonuç olarakta hastalıklara neden olmaktadır (Valko vd. 2007).

2.3.3 Serbest radikallerin sınıflandırılması

Serbest radikaller iki ana gruba ayrılmaktadır.

- 1) Reaktif Oksijen Türleri (ROT)
- 2) Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)

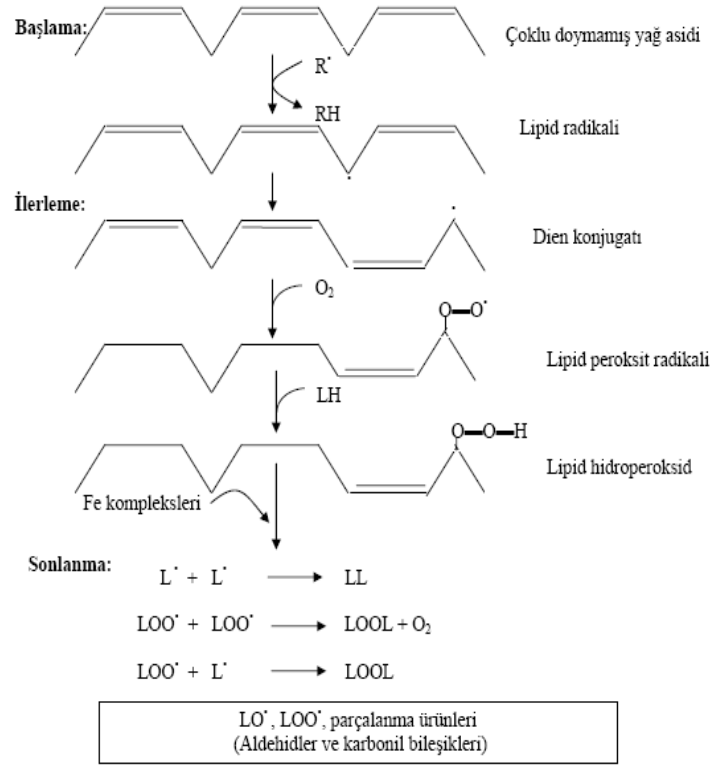
ROT grubu, birçok radikal ve radikal olmayan molekülleri içermektedir. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalı ($OH^{\cdot}$), peroksil radikalı ($RO_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalı ($HRO_2^{\cdot-}$), hipoklorit anyonu ($ClO^{\cdot-}$) gibi radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$) gibi radikal olmayan bileşikler bu grupta yer almaktadır (Evans vd. 2002, Valko vd. 2004, Valko vd. 2005).

RNT grubu ise, nitrik oksit ($NO^{\cdot}$), nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot-}$) gibi serbest radikaller ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) ve alkil peroksinitrat ($RONOO$) gibi radikal olmayan molekülleri içermektedir (Carr vd. 2000, Ghafourifar ve Cadenas 2005).

2.4 Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre zarı yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu biyokimyasal olay; başlama, ilerleme ve sonuç basamağından oluşmaktadır.

Başlama basamağında, bir serbest radikal ($X^{\cdot}$) ile doymamış yağ asiti (LH) molekülünün reaksiyonu sonucu, (H) atomu transferi gerçekleşmekte ve bir lipit radikalının ($L^{\cdot}$) oluşumuna neden olmaktadır. İlerleme basamağında, oluşan $L^{\cdot}$ radikaline oksijenin eklenmesiyle birlikte lipit peroksit radikalı oluşmaktadır. Bu peroksi radikalı, diğer bir yağ asidi molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroperoksitlere ve yeni lipit radikallerine dönüşmektedir. Son basamakta ise, oluşan radikaller birbirleriyle reaksiyona girerek radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi kararlı bileşiklere dönüşmektedir (Şekil 2.9) (Şekeroğlu vd. 2000, Niki vd. 2005).



Şekil 2.9 Doymamış yağ asitlerin peroksidasyonu (Şekeroğlu vd. 2000)

Bu yıkımın ürünleri DNA veya proteinler ile reaksiyona girerek, mutajenik etki göstermektedir. Üç veya daha fazla çift bağa sahip olan yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA) bileşikler oluşmaktadır. MDA, hücre zarında yer alan bileşiklerin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına yol açmaktadır (Masella vd. 2005).

2.5 Antioksidan Savunma Sistemi

Serbest radikallerin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar, antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır. Antioksidan moleküller ekzojen ve endojen kaynaklı bileşikler olup, oksidan moleküllerin oluşturduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirmektedir. Hücre dışı savunma sistemi, bilirubin, transferin, seruloplazmin ve ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir (Taysi vd. 2002).

Hücre içi antioksidan savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan komplekslerden oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2001). Enzimatik antioksidan savunma sistemi, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) ve sitokrom oksidaz'dan oluşmaktadır (Khan vd. 2010). Ayrıca, bakır, çinko ve selenyum gibi elementler bu enzimlerin fonksiyonları için gerekmektedir (Altan vd. 2006).

Enzimatik olmayan antioksidanlar ise alfa-tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), tiyol grubu içeren antioksidanlar (glutatyon, tiyoredoksin ve lipoik asit), melatonin, karotenoid, flavonoid bileşikleri ve diğer antioksidanlardan oluşmaktadır (Çizelge 2.2) (Pastore vd. 2003).

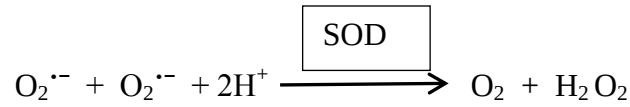
Çizelge 2.2 Biyolojik sistemlerde bulunan antioksidan savunma sistemi

Enzimatik savunma sistemi	Enzimatik olmayan savunma sistemi	
Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (KAT) Glutatyon peroksidaz (GPx) Glutatyon-S-transferaz (GST) Glutatyon redüktaz (GR) Sitokrom oksidaz	A-lipoik asit Glutatyon (GSH) α -Tokoferol (vitamin E) Askorbik asit (vitamin C) β -karoten Flavonoidler Ürat	Albümin Seruloplazmin Transferin Ferritin Laktoferrin Melatonin Sistein Bilirubin

2.5.1 Enzimatik antioksidanlar

2.5.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) yüksek oranda reaktif olan süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüşümünü katalize etmektedir (Perry vd. 2010). SOD aktif bölgesinde bulunan metal iyonlarının ping-pong mekanizmasıyla arka arkaya oksidasyonu ve indirgeme geçişini yaparak, süperoksit anyonunun yıkımını hızlı bir reaksiyon ile gerçekleştirmektedir. SOD'un tüm izozimleri genellikle, azid ve florit gibi tek yüklü anyonlara bağlanmaktadır (Mates vd. 1999).



Ökaryotik hücrelerde SOD'un iki tane intrasellüler izozimi bulunmaktadır. Bu izozimler Cu/Zn SOD ve Mn-SOD olarak tanınmaktadır. Cu/Zn- SOD (SOD-1), ilk defa 1938 yılında Mann ve Keilin tarafından sığır eritrositinden izole edilmiştir. SOD-1, 32 kDa'luk bir homodimer yapıya sahip olup, tüm hücrelerin sitozolünde ve çekirdeğinde yer almaktadır (Perry vd. 2010). Bu izozimin her alt ünitesi bir metal kümeyi içermektedir. Bu metal küme, enzimin aktif bölgesi olarak bilinmektedir. Aktif bölgede bulunan bakır ve çinko atomları bir histamin bileşiğinin yardımıyla birbirine bağlanmaktadır (Battistoni vd. 1998). Ayrıca, N_3^- , CN^- ve F^- iyonları bu enzimin rekabetçi inhibitörleri olarak tanınmaktadır (Vance ve Miller 1998).

Mn-SOD (SOD-2), 96 kDa'luk ağırlığa sahip olan ve her alt ünitesinde bir Mn^{2+} atomu bulunduran, bir homotetramer enzim olarak tanınmaktadır. SOD-2 genellikle, hücrelerin mitokondri matriksinde yer almaktadır. (Perry vd. 2010).

1989 yılında Marklund ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise SOD'un üçüncü izozimi saptanmıştır. Bu izozim, ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD) olarak adlandırılmıştır.

EC-SOD genellikle hücre dışındaki sıvılarda, örneğin; lenf, sinoviyal sıvı ve plazmada bulunmaktadır (Marklund vd. 1982, 1986). EC-SOD tetramer yapıya sahip olan bir glikoprotein yapısıdır. Her tetramer iki dimer alt ünitelerden oluşmaktadır. Bu dimerler karboksi terminallerinde yer alan sistein (Cys) amino asitlerinin, disülfid köprüleri yapması sonucu birbirine bağlanmaktadır (Fattman vd. 2000). EC-SOD'un her alt ünitesinde bir bakır ve bir çinko atomu bulunmaktadır (Mates vd. 1999). Bu enzim heparin ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikan bileşiklerine yüksek afinite göstermektedir (Mates vd. 1999).

2.5.1.2 Katalaz (KAT)

Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6) 240 kDa ağırlığa sahip olan tetramerik bir enzimdir. KAT'ın her alt ünitesi 60 kDa olup ve bir ferriprotoporfirin grubunu içermektedir (Mates vd. 1999). Katalaz enzimi su ve oksijen molekülünü oluşturmak üzere H_2O_2 ile çok verimli bir şekilde reaksiyona girmektedir (Chelikani vd. 2004).



Bugüne kadar, katalaz enziminin 300'den fazla dizisi bulunup, bu enzim dizileri 3 izozim şeklinde gruplandırılmaktadır. Bu gruplar, monofonksiyonel hem içeren katalazlar, bifonksiyonel hem içeren katalaz-peroksidazlar ve manganez içeren katalazlar olarak tanınmaktadır (Chelikani vd. 2004).

Monofonksiyonel hem içeren izozim, katalaz enziminin en yaygın bulunan izozimi olarak tanınmaktadır. Enzimin her alt ünitesinin ağırlığının 60-75 kDa olduğu bilinmektedir (Klotz vd. 1997). Azid, aminotriyazol ve siyanid, bu enzimin hem grubunda yer alan demir atomuna bağlanarak, enzimi inhibe etmektedir (Chelikani vd. 2004).

Doğada, bifonksiyonel katalaz-peroksidaz izozimi, monofonksiyonel izozimine göre daha az oranda görülür, ancak monofonksiyonel izozimi gibi yapısında hem grubu

bulunmaktadır. Bu izozim, monofonksiyonel izozimi gibi H_2O_2 molekülüne yüksek afinite gösterip, H_2O_2 'e bağlanarak onu H_2O ve O_2 'e dönüştürmektedir. Yalnız, bifonksiyonel izozimler, metanol, etanol, formik asit ve fenoller gibi (H) verici organik bileşiklere yüksek afinite göstermektedir (Mates vd. 1999, Chelikani vd. 2004).



Üçüncü izozimin aktif bölgesinde hem grubu yerine manganez atomun bulunması nedeniyle hem içermeyen katalaz olarak tanınmaktadır. Bu izozim, homohekzamerik bir yapıya sahip olup, doğada sadece bakterilerin yapılarında bulunmaktadır (Klotz ve Loewen 2003).

2.5.1.3 Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.19) 80 kDa ağırlığında, aktif bölgesinde selenyum atomu içeren ve tetramerik yapıya sahip olan bir peroksidaz enzim tipidir. Enzimin her alt ünitesi bir selenosistein bileşiğini içermektedir. GPx, genel olarak sitozolda yer almaktadır (Mates vd. 1999). GPx enzimi, redüklenmiş glutasyon tripeptidi (GSH) ile hidrojen peroksit molekülünün reaksiyonunu katalize ederek hidrojen peroksit molekülünün suya çevrilmesini sağlamaktadır. Böylece hücre membranı ve hücre içinde bulunan organelleri oksidatif strese karşı korumaktadır (Drevet 2006).

Glutasyon peroksidaz enzimi iki tane substrata sahiptir. Bunlardan biri peroksitler, diğeri ise redüklenmiş glutatyondur. Peroksit molekülleri alkollü bileşikleri indirgenirken, GSH bileşiği yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyon dönüşmektedir (Drevet 2006).

Memelilerde, bugüne kadar GPx enziminin 5 izozimi tanınmaktadır. Bu izozimler GPx-1 (cGPx), GPx-2 (GPx-G1), GPx-3 (GPx-P), GPx-4 (PHGPx) ve GPx-5 olarak adlandırılmaktadır (Mates vd. 1999).

GPx-1 (cGPx), eritrosit, böbrek ve karaciğer hücrelerinin sitozol ve mitokondrisinde bulunmaktadır. Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (GPx4 yada PHGPx) genellikle sitozolde ve membranlarda bulunmaktadır. GPx-4 normal olarak böbreğin epiteliyal hücrelerinde ve testislerde yüksek düzeyde görülmektedir. GPx-2 genel olarak sitozolde, GPx-3 ise ekstrasellüler alanda görülmektedir. GPx-2 ve GPx-3 mide-bağırsak ve böbrek alanı dışında diğer dokularda fazla bulunmamaktadır. Son zamanlarda, GPx ailesinin yeni bir üyesi olarak tanınan GPx-5, genel olarak farelerin epididim dokusunda bulunmaktadır. GPx-5 izozimi selenyuma bağımsız bir enzim olarak tanınmaktadır (Mates vd. 1999).

2.5.1.4 Glutatyon-S-transferaz (GST)

Detoksifikasyon, yabancı bileşiklerin (ksenobiyotiklerin) hücrelerden uzaklaştırılmasını sağlayan bir proses olarak bilinmektedir. Genel olarak ilaçlar, kimyasal kirleticiler, herbisitler ve insektisitler ksenobiyotik bileşikler olarak tanınmaktadır (Guengerich 1990).

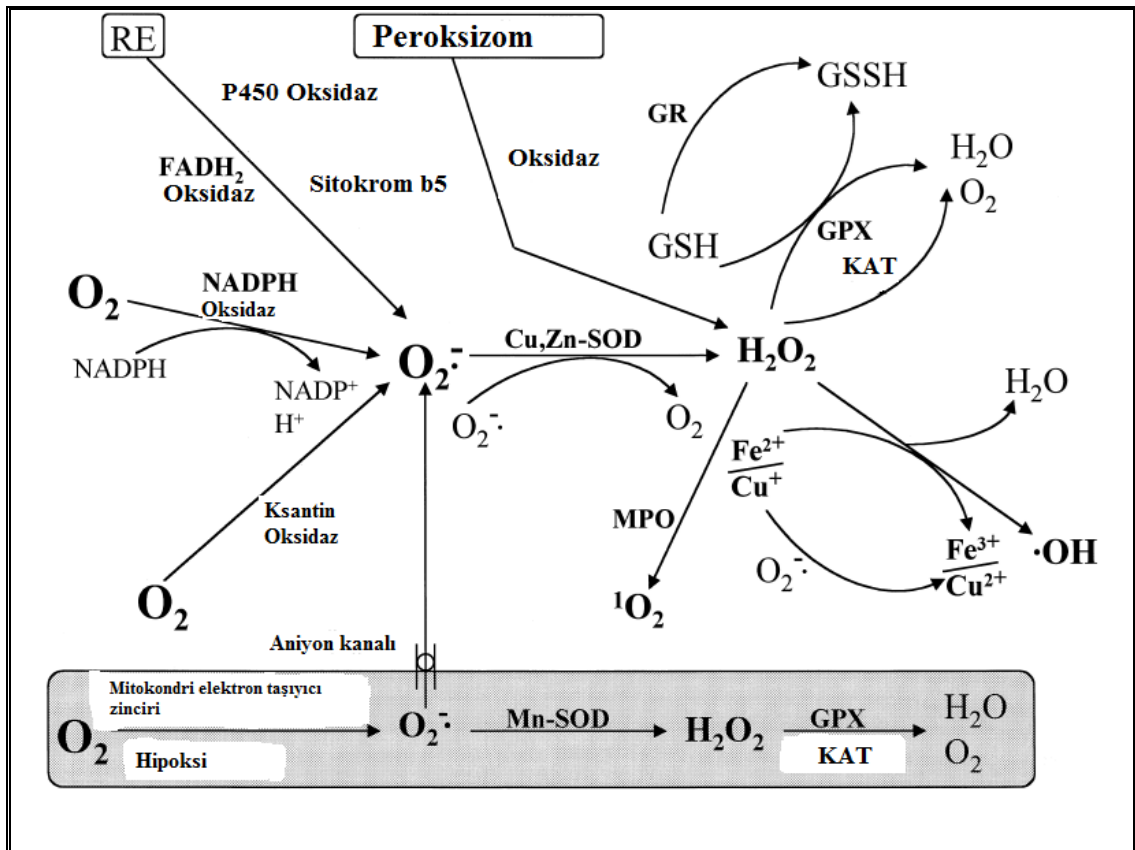
Detoksifikasyon prosesi, genel olarak faz I ve faz II olarak adlandırılır ve iki basamakta gerçekleşmektedir (Sheehan vd. 2001). Faz I reaksiyonları, yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz gibi reaksiyonlar gerçekleşirken, Faz II reaksiyonlarında substratın hazırlanması sağlanmaktadır (Armstrong 1997). Faz II'de sülfat, asetat, glukoronik asit, glutatyon ve glisin gibi endojen maddeler ile konjugasyon reaksiyonlar gerçekleştirilip, böylece ara metabolitlerin polaritesi artırılarak, böbrek ve mide-bağırsak sisteminden atılması gerçekleştirilmektedir (Eaton ve Bammler 1999).

Glutatyon-S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18), elektrofilik ksenobiyotikleri konjuge ederek, inaktif hale getirip, onların vücuttan atılmasını sağlayan bir dimerik enzimdir. GST, detoksifikasyon yolunun son ürünü olan merkapturik asit oluşumunun ilk aşamasını katalizleyerek homeostasisin sağlanmasına neden olmaktadır. Bu aşamada, glutatyon (GSH) ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması gerçekleşmektedir. Böylece, bu bileşiklerin suda daha fazla çözünmesini, daha az toksik olarak, daha kolay vücuttan atılmasını sağlamaktadır (Townsend ve Tew 2003).

GST enzimi, faz II metabolizmasının önemli enzimi olarak bilinmektedir. GST enzimi doğada bakteriler, mayalar, küfler, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunmaktadır. GST, sitozolik bir enzim olarak, genellikle karaciğer, incebağırsak, kalınbağırsak, böbrek, akciğer, meme, kas, dalak, testis ve plasentada bulunmaktadır (Sheehan vd. 2001).

Bugüne kadar GST enziminin, vertebralılarda 7 izozimi bulunmaktadır. Bu izozimler, alfa, mü, kappa, pi, sigma, tetta ve zeta olarak adlandırılmaktadır. İnsanlarda ise GST enzimi alfa, mü, pi, tetta ve sigma olmak üzere 5 izoformada görülmektedir (Sheehan vd. 2001).

Sonuç olarak, enzimatik savunma sisteminde rol yapan enzimlerin katalizlediği reaksiyonların özeti bir şema halinde şekil 2.10'da verilmektedir.



Şekil 2.10 Enzimatik antioksidan savunma sistemi (Mates vd. 1999)

2.5.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar

E vitamini yağda çözünen bir vitamin türü olarak, lipit peroksidasyonunu önlemektedir. Bu vitamin doğada 8 farklı formda bulunmaktadır. Bunlardan biri olan alfa-tokoferol insanda en çok aktif bulunan formu olmaktadır. Hücre membranında çok önemli bir antioksidan olarak yer alan alfa tokoferol, OH[•] radikalinin oluşturduğu lipit peroksidasyonu inhibe etmek için, peroksil radikali ile reaksiyona girebilmektedir (Van Haaften vd. 2001, Kojo 2004).



Böylece α -tokoferol, α -tokoferol-O[•]'e dönüşerek yeni bir radikal formunu oluşturmaktadır. Oluşan bu radikal tipi, başka bir yağ asidiyle birleşebilme yeteneğiyle, zincir reaksiyonunu durdurmaktadır. Oluşan α -tokoferol-O[•] radikali (tokoferoksil) hücre membran yüzeyinde bulunan askorbik asit ile (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar α -tokoferol formuna dönüşmektedir (Van Haaften vd. 2001, Kojo 2004).



C vitamini suda çözünen bir vitamin tipidir. Bu vitamin sahip olduğu prooksidatif işlemleri durdurma özelliğiyle kuvvetli bir antioksidan olarak tanınmaktadır. Bu vitamin kollajen sentezinde, tirozin amino asitinin yıkımında, epinefrin bileşiğinin sentezinde, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici rol oynamaktadır. C vitamini, E vitamini ile birlikte membran ve lipoprotein yapılarında α -tokoferoksil radikalinin tekrar α -tokoferola dönüşmesini sağlamaktadır (Kojo 2004, Duarte ve Lunec 2005, Hathcock vd. 2005).

Glutatyon (GSH) (γ - glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. GSH bileşiği hücre için en önemli tiyol grubu içeren antioksidan bileşiği olarak tanınmaktadır. GSH suda çözünen bir yapıya sahip olmakla birlikte yüksek miktarda sitozolde (1-11mM), çekirdekte (3-15mM) ve mitokondride (5-11mM) bulunmaktadır. GSH hücre içinde, sitozolde bulunan glutamat-sistein ligaz ve glutatyon

sentetaz enzimleri yardımıyla üretilerek taşıyıcı proteinlerin yardımıyla mitokondri içine taşınmaktadır (Shen vd. 2005, Valko vd. 2007). Çekirdeğin içinde bulunan GSH, kritik redoks durumunda, DNA'nın tamiri ve ekspresiyonunda görev alan sülfidrilli proteinleri korumaktadır. Oksitlenmiş glutatyon, hücreler içinde birikmektedir. GSH/GSSG oranı, hücrenin oksidatif stres durumunun iyi bir ölçütü olarak bilinmektedir (Jones vd. 2000, Nogueria vd. 2004).

Glutatyonun oksidatif strese karşı koruyucu rolleri bilinmektedir. Örneğin; glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz ve oksidatif strese karşı rol alan enzimlerin kofaktörü olarak tanınmaktadır. Ayrıca GSH, hücre zarında amino asitlerin taşınmasında rol oynamaktadır. Hücre içinde doğrudan GSH hidroksil ve oksijen radikallerinin süpürücüsü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca GSH, glutatyon peroksidazın katalitik etkisi ile hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonuna neden olmaktadır. GSH ayrıca, bir çok antioksidan bileşiğinin rejenerasyonuna sebep olmaktadır. Örneğin; glutatyon, tokoferol radikalinin, vitamin E formuna ve dehidroaskorbatın, askorbat formuna indirgenmesini sağlamaktadır (Masella vd. 2005, Valko vd. 2007).

Alfa-lipoik asit (ALA) ise önemli bir antioksidan olarak tanınmaktadır. Bu bileşik, bitkiler, hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenmektedir. ALA, oksitlenmiş veya indirgenmiş iki sülfür molekülünü içermektedir. Hem yağda, hem suda çözünüp, dolayısıyla hem hücre zarında hem de sitozolde bulunmaktadır. ALA, günlük besinden kolaylıkla alınıp, hızla indirgenerek dihidrolipoik asit formuna dönüşmektedir (Semith vd. 2004). Hem ALA hem de dihidrolipoik asit (DHLLA) güçlü antioksidan etkiye sahip olup, serbest radikallerin temizlenmesine, metal iyonların şelasyonuna ve oksidatif stres nedeniyle hasar gören proteinlerin onarımını sağlamaktadır (Valko vd. 2007).

Karotenoidler, bitkilerde ve mikroorganizmalarda renkli pigmentler olarak bilinmektedir. A vitamininin üretiminde yer alan β -karoten, karotenoidlerin en önemli üyesi olmaktadır (Mortensen vd. 2001). Karotenoidler; peroksil, hidroksil ve oksijen radikallerini baskılayarak hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır (Stahl ve Sies 2003).

2.6 Kansere Genel Bakış

Kanser, hücrenin büyümesi ve farklılaşmasını etkileyen mutasyonlar sonucu oluşan ölümcül bir hastalıktır. Kontrolsüz hücre büyümesi, farklılaşması ve anormal hücrenin yayılması şeklinde tarif edilmektedir. Genlerde meydana gelen bir seri mutasyon sonucu kontrolsüz olarak bölünmeye uğrayan bir hücrenin meydana getirdiği primer tumor hücreleri pek çok farklı fenotipik özellikler kazanmaktadır. Bu değişimler tümör hücrelerinin kontrolsüz ve sınırsız olarak çoğalmalarına neden olmaktadır. Ayrıca, çevrelerinden bağımsız olarak yaşayabilen bu hücreler, başka dokulara hareket edebilme (metastaz) özellikleri nedeniyle diğer doku ve organlarının işlevlerini de etkilemektedir (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanserler, hücre tipine göre genellikle dört gruba ayrılmaktadır. Kanserinin iki tipi olan lösemiler ve lenfomalar beyaz kan hücreleri olan lökosit ve lenfositlerin gereğinden fazla üremesinden dolayı oluşmaktadır. Sarkomalar, kas, kemik ve kıkırdak gibi embriyolojik mezoderminden gelişen dokuların tümörü olarak tanınmaktadır. Karsinomalar kanserlerin %85'ini oluşturmakta ve bunlar bezler, meme, deri ve ürogenital dokulardan (prostat, rahim ağzı gibi) köken almaktadır (Dilsiz 2009).

Kanser tedavisi birçok zorluk içermektedir. Bunlardan en çok karşılaşılanı hücrelerin ilaca karşı savunma özellikleri kazanarak ilaç direnci oluşturması, kullanılan ilaçların normal hücreleri etkilemesi ve hücrelerin o bölgeden uzaklaştırılmasına rağmen kolayca metastaz yapabilme özellikleridir (Demirtaş vd. 2009, Mesquita vd. 2009).

Bu çalışmada, günümüz tedavi sürecinde hızlı çoğalan hücre profili gösteren kanser ve diğer proliferatif hastalıklarda kullanılan kemoterapötiklerin hedefe özgü etkinliklerini arttırmak için hücresel savunma mekanizmalarını kontrol edip düzenleyecek düşük toksisitede doğal kaynaklara dayalı kemoterapötiği destekleyici fitokimyasalların tespit edilmesidir. Bu amaca ulaşmak için bu çalışmada, Ankara'nın çeşitli bölgelerinden toplanan bitkilerin metanol özütlerinin antikanser etkisi insan akut promiyelositik lösemi (HL-60) ve meme kanseri (MCF-7) hücre modelleri üzerinde XTT metodu ile incelenmiştir.

2.6.1 Meme kanseri

Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır. Tek bir hastalık gibi görünse de, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalıktır ve hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en fazla görülen kötü huylu tümör olarak, kadınlarda görülen tüm kanserlerin %30'unu oluşturmaktadır (Greenlee vd. 2000). Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenler bu hastalığın oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Tannock ve Hill 1992). BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility Gene 1) ve BRCA2 (Breast Cancer Susceptibility Gene 2) kalıtsal meme kanserinin oluşumunda etkili olan en önemli iki tümör süpresör geni olarak tanınmaktadır (Gürtünç 2007). Günümüzde, meme kanser tedavisinde, cerrahi, ilaç tedavi ve radyoterapi meme kanser tedavisinde en yaygın yöntemler olarak tanınmaktadır. Ama tüm kullanılan yöntemlere rağmen, henüz meme kanserini kesin önleyen bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Günümüzde bilinen tek yöntem, erken teşhisdir. Erken tanı sayesinde, meme kanserinin getirdiği sorunlar büyük oranda çözülebilmektedir. Bu sayede hastalığın yaptığı hasar en aza indirilmek ile, yaşam süresi ve kalitesi önemli ölçüde arttırılmaktadır. Meme kanserine model hücre hatlarından biri olan MCF-7 hücreleri, ilk olarak 69 yaşında beyaz ırk bir bayan hastanın meme epitel dokusundan elde edilmiştir. Bu hücre modeli, tek katmanlı büyüyen yapışkan hücre hattı olarak bilinmektedir (Gürtünç 2007).

2.6.2 İnsan akut promiyelositik lösemi

Lösemi, vücudun bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan beyaz kan hücrelerinin (akyuvarlar) kontrolsüz çoğalması sonucunda oluşan bir çeşit kanser tipidir. Bu hastalıkta, etkilenen hücreler (granülositler, lenfositler, retikülohistiyositler ve plazma hücreleri) kontrolden çıkarak bağımsız bir şekilde hareket etmeye başlar ve kan hücrelerinin üretildiği organlara, ve bazen başka organ ve dokulara yerleşerek yapısal yıkıma neden olmaktadır. Lösemiler kendi içinde akut (hızlı ilerleyen) ve kronik (yavaş ilerleyen) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ayrıca, etkilenen lökosit tipine göre ise miyeloid ve lenfoid olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Genel olarak lösemi hastalığının 4 önemli tipi bulunmaktadır. Bunlar; kronik lenfositik lösemi, kronik

miyelositik lösemi, akut lenfositik lösemi ve akut miyelositik lösemi olmak üzere sıralandırmaktadır (Özçimen 2005). Bazı lösemi hastaların ilaç tedavisinde, ilaca dirençli lösemi hücreleri bulunmaktadır, dolayısıyla günümüzdeki tedavi seçenekleri bu hastaları iyileştiremez bir duruma gelmesine sebep olmaktadır (Wang vd. 2009). Bu nedenle günümüzde lösemi hücrelerini kemoterapinin etkilerinden koruyan mekanizmalar ve ilaç direncini geri çeviren yöntemler konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçta, yeni ilaçlar sentezlemek veya doğal (botanik) kaynaklardan yeni ilaçlar elde etmek için kapsamlı testler yürütülmektedir. Bu amacı takip ederek bu çalışmada, Ankara'nın farklı bölgelerinde yetişen bitki özütlerinin antikanser etkisi insan akut promiyelositik lösemi hücre modeli (HL-60) üzerinde incelenmiştir. HL-60 hücre dizisi ilk olarak Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından 36 yaşında akut promiyelositik hastası olan bir bayandan elde edilmiştir. Genellikle bu hücreler her 36-48 saat süre içinde bölünmektedir (Ratanachoo vd. 2002).

2.7 Mikroorganizmalar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, bitkilerden elde edilen metanollü özütlerin antimikrobiyal etkileri 5 çeşit mikroorganizma suşu üzerinde incelenmiştir.

2.7.1 *Bacillus subtilis*

Genelde toprakta bulunup ve Gram (+) bir bakteri olarak tanınmaktadır. *B. subtilis* gıdaların kontaminasyonuna neden olmaktadır (Ryan ve Ray 2004).

2.7.2 *Staphylococcus aureus*

Gram (+) bir bakteri olarak, normal şartlarda insan derisinde ve mukozasında yaygın bir şekilde kolonize olmaktadır. Eğer vücuda girme imkanı bulursa hastalığa neden olmaktadır (Ryan ve Ray 2004).

2.7.3 *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesine ait olan bir Gram (-) bakteridir. Hasta ve sağlıklı hayvanlar ve insanların bağırsaklarında bulunmaktadır. *E. coli* mide ve bağırsak sistemde yüksek miktarda bulunmaktadır. Ayrıca, *E. coli* bakteriyel enfeksiyon, neonatal menenjit , üriñer sistem enfeksiyonu ve gastroenteriteye neden olmaktadır (Murray vd. 1990).

2.7.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa özellikle, bağışıklık yetersizliği olan hastalarda solunum ve idrar yollarının, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojeni olarak tanınıp, aynı zamanda kanda da enfeksiyona sebep olmaktadır. Nozokomial (hastane kaynaklı) enfeksiyonların onda biri *P. aeruginosa*'dan kaynaklanmaktadır. Kistik fibroz hastaları özellikle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına yatkın olmaktadırlar. *P. aeruginosa* kirli küvet ve jakuziler gibi su kalitesinin düşük olduğu durumlara maruz kalındığında dermatite sebep olmaktadır (Ahmed vd. 2001).

2.7.5 *Candida albicans*

Normalde sindirim sistemi florasında yer alan bir maya çeşitidir. *C. albicans* insanlarda oral ve genital enfeksiyonlara neden olmaktadır . Sistemik mantar enfeksiyonu daha çok zayıf immün sistemine sahip olan hastalarda görölmektedir (Walsh vd. 2004, Hube ve Enfert 2007) .

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu tez kapsamında incelenen bitki örneklerinin listesi çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan bitki örnekleri

Familya	Cins	Bitki Türü
Asteraceae	<i>Centaurea</i>	<i>Centaurea virgata</i> Lam.
Asteraceae	<i>Cichorium</i>	<i>Cichorium intybus</i> L.
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.
Fabaceae	<i>Melilotus</i>	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum</i>	<i>Zygophyllum fabago</i> L.

Tez çalışmasında kullanılan bitki türleri Temmuz ve Ağustos (2009) aylarında Ankara’nın farklı bölgelerinden toplanmıştır. Bitkiler özüt hazırlamak üzere kurutulmuş ve depolanmıştır. Bitkilerin toplandığı bölge ve tarihler çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Bitkilerin toplandığı lokasyonlar

Familya	Bitki Türü	Lokasyon
Asteraceae	<i>Centaurea virgata</i> Lam.	Yenikent-Zir vadisi 17.07.2009
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i> L.	Elvan-Peçenek arası 10.08.2009
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	Yenikent-Zir vadisi 17.07.2009
Fabaceae	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	Elvan-Peçenek arası 10.08.2009
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum fabago</i> L.	Konya yolu-Etiler kavşağı 09.08.2009

Bitki örneklerinden elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitelerini incelemek amacıyla 5 farklı mikroorganizma seçilmiştir. Bu amaçla, Gram (+) bakterilerden *Bacillus subtilis* ATCC-6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram (-) bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 ve *Escherichia coli* ATCC-25922 ile ökaryotik bir maya olan *Candida albicans* ATCC-10231 seçilmiştir. Kullanılan mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Ayrıca, bitki özütlerinin sitotoksosite etkilerini incelemek amacı ile akut promiyelositik lösemi hücre hattı (HL-60) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan kanser hücre modelleri ŞAP ensitütüsü'nden temin edilmiştir. Bitkilerden elde edilen özütlerin antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimler üzerinde olan etkilerini incelemek amacıyla sığır karaciğerinden homojenat hazırlanmıştır. Sığır karaciğeri Kazan mezbahasından temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan; 4-aminoantipirin (4-AP), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sodyum azit (NaN_3) Acros firmasından, sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat) Carlo Erbu firmasından, 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil-2-tetrazoliyum-5-karboksi-anilid) tüzü (XTT) Cell signaling firmasından, sodyum karbonat (Na_2CO_3), tert-butil hidroperoksit (t-BOOH) ve trikloroasetik asit (TCA) Fisher Scientific firmasından, ditiyoteritol (DTT), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), nitro blue tetrazolyum (NBT)

ve sodyum hidroksit (NaOH) Fluka firmasından, nikotinamidadenin dinükleotit fosfat (NADPH) Gebru firmasından, gentamisin solüsyonu, fetal sığır serumu, L-glutamin, penisilin/streptomisin, RPMI 1640, tripsin ve tripan mavi boyası Hyclone firmasından malt ekstrat agar (MEA) ve nurient agar (NA) İgs firmasından, alüminyum klorür (AlCl_3), bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), baryum klorür (BaCl_2), etil alkol (EtOH), gallik asit (GA), nutrient broth (NB), potasyum klorür (KCl), sodyum asetat, sodyum klorür (NaCl) ve sülfürik asit Merck firmasından, dimetil sülfoksit (DMSO), %99'lük metanol, potasyum mono fosfat (K_2HPO_4) ve potasyum di fosfat (KH_2PO_4) Riedel-de Haen firmasından, 2,6-di-tert-butil-4-metil fenol (BHT), etilenediaminetetraasetik asit (EDTA), Folin-Ciocalteu reaktifi, glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz enzimi (GR), horseraddish peroksidaz (HRP), katalaz enzimi (KAT), ksantin, ksantin oksidaz (XOD), kuersetin dihidrat, sığır serum albumin (BSA), sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS), 1,1,3,3- tetra etoksi propan (MDA) ve 2-tiyobarbiturik asit (TBA) Sigma firmasından temin edilmiştir.

Tüm enzim çalışmasında kullanılan deneye özgü mikropalakalar Brand firmasından temin edilmiştir. Ayrıca, antimikrobiyal deneylerde kullanılan steril diskler Oxoid firmasından temin edilmiştir.

Tez çalışması boyunca; bitki özütlerin hazırlanması için rotari evaporator (Büchi B-490), ekstraktların toplam protein, polifenol ve flavonoid bileşiklerin tayininde ve ayrıca TBARS metodunda spektrofotometrik ölçümler almak amacıyla UV-vis spektrofotometre (HP 8453 A), mikroskalada enzim aktivite tayini amacıyla ise multimod mikropalaka okuyucu (Spectra Max M2e) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan diğer önemli cihazlar ise hassas terazi (Denver Inst), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph Mr Hei), çeker ocak, saf su cihazı (Millipore) ve ultra saf su sistemi (Millipore), buz dolabı (Bosch), buz makinesi (Scotsman AF80), Doku ve hücre kültürü çalışmaları için steril çalışma kabini (Bilser), CO_2 inkübatörü (New Brunswick), yatay otoklav, biyolojik mikroskop (Motic), derin dondurucu ($-20\text{ }^\circ\text{C}$, Bosch), derin dondurucu $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (Hettich), pH metre (Mettler Toledo), soğutucu santrifüj (Hettich), ultra yüksek devirli soğutmalı ve vakumlu santrifüj (Hanil Science), vorteks (Heidolph) ve otomatik pipetler (Gilson ve Biohit) kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması, saklanması ve tür teşhisi

Tez kapsamında çalışılan bitki örnekleri (Çizelge 3.1) Temmuz ve Ağustos (2009) aylarında Doç. Dr. Fatmagül GEVEN tarafından Ankara'nın çeşitli bölgelerinden toplanmış ve tür teşhisi yapılmıştır. Kullanılan bitki örneklerinin bir kısmı daha sonra referans olarak kullanma amacıyla Ankara Üniversitesi Herbaryumu'nda saklanmıştır.

3.2.2 Ekstraksiyon öncesi bitki örneklerinin hazırlanması

Toplanan bitki örnekleri musluk suyu ile yıkanmış ve böylece arazi şartlarından kaynaklanan kirlilikten arındırılmıştır. Sonra, temiz bir odada iki haftalık süre içerisinde kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur.

Kurutma işleminden sonra bitki örnekleri etiketlenmiş ve uygun saklama kutularına alınmıştır. Herbaryum'da kayıt altına alınmış olan bitkilerin etiket numaraları (voucher no) ve tür teşhis bilgileri çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Bitki örneklerine verilen etiket numaraları

Familya	Bitki Türü	Etiket Numarası
Asteraceae	<i>Centaurea virgata</i> Lam.	FG2010-11
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i> L.	FG2010-27
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	FG2010-25
Fabaceae	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	FG2010-21
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum fabago</i> L.	FG2010-16

Bu bitkilerden, *Centaurea virgata*, *Cichorium intybus* ve *Melilotus officinalis*'in çiçek kısmı, *Euphorbia macroclada*'nın çiçek ve yaprak kısımları ve *Zygophyllum*

fabago'nun yaprak ve meyve kısımları tez çalışması kapsamında incelenmek üzere seçilmiştir.

3.2.3 Bitki örneklerinin ekstraksiyona hazırlanması

Belli bitki kısımlarının ekstraksiyon aşamasına hazırlanması için bitki örnekleri sıvı azot yardımıyla iyice ezilmiş ve tamamen toz haline getirilmiştir. Sıvı azot, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Toz haline getirilmiş olan bitki örnekleri 50mL'lik falkonlar içine alınmış ve oda ısısında saklanmıştır.

Ekstraksiyon aşamasında bitki örneklerinden polar ve apolar bileşiklerce zengin özüt elde edilmesi amacıyla %99'luk metanol çözgeni kullanılmıştır (Cowan 1999). Bitki ekstraksiyon işleminde 2gr toz bitki örneğine 20mL çözgen (toz ağırlık-çözgen hacim oranı 1:10 olacak şekilde) eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemine oda ısısında 30dk şiddetli karıştırma yoluyla başlatılmıştır. +4°C'de 24 saat bekletilen ekstraksiyon karışımı, +4°C, 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant (sıvı fazı) ise temiz bir cam balona transfer edilmiştir. 40°C, 337 mBar basınç uygulanarak rotari evaporatör yardımıyla süpernatandaki çözgen uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen konsantre özüt çözünemediği miktarda DMSO'da çözünmüştür. Çözünen bitki özütleri alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır (Ertürk 2003, Çoruh vd. 2007).

3.2.4 Bitki özütlerinin antimikrobiyal analizi

Bitki özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, 4 bakteri suşu (*Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC-27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC-25923) ve bir maya suşu (*Candida albicans* ATCC-10231) seçilmiştir.

3.2.4.1 Mikroorganizmaların üremesi için besi yerlerinin hazırlanması

Antimikrobiyal etki analizinde bakterilerin üretilmesi için gerekli olan katı besi yeri için nutrient agar ve maya suşunun üretilmesi için malt ekstrakt agar kullanılmıştır. Nutrient agar besi yeri için 28 gr besi yeri 1L dH₂O içinde çözülmüştür. Malt ekstrakt agar'ın hazırlanmasında ise 39 gr besi yeri 1L dH₂O içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Mikroorganizmaların standardizasyonunda sıvı besi yeri olarak nutrient broth kullanılmıştır. Besi yerinin hazırlanması için 8 gr besi yeri 1L dH₂O içinde çözülmüştür. Hazırlanan ve sterilize edilen besi yerleri, petri kaplarına ortalama 4.0 mm (± 0.5 mm) derinlikte olacak şekilde dökülmüştür. 120 mm'lik çapında olan bir petri kapı yaklaşık 40 mL besi yeri içermiştir. Sıvı besi yerinde ise, hazırlanan ve sterilizasyon işleminden geçen besi yeri 16×16 mm'lik steril cam tüplere alınmıştır. Her steril cam tüp yaklaşık 10 mL besi yeri içermiştir. Tüm besi yerleri hazırlandıktan sonra 4°C'de saklanmıştır (Silici ve Koç 2006, Altuner ve Çetin 2009). Besi yerlerin döküm ve sterilizasyon işlemleri Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2 Bitki özütlerin disklerle emdirilmesi

Bitki örneklerinden elde edilen özütler, 6 mm'lik boş ve steril antibiyotik disklerine 5 µL ve 20 µL oranında emdirilmiştir. Özütlerin emdirildiği diskler bir gün oda ısısında kurumaya bırakılmıştır (Altuner ve Çetin 2009).

3.2.4.3 Mikroorganizmaların standardize edilmesi

Disk difüzyon yönteminde, besi yerlerine yayılan mikroorganizma kültürlerinin standart miktarda mikroorganizma içermesi gerekmektedir. Bu amaçla mikroorganizma kültürleri serum fizyolojik (%0.9 NaCl çözeltisi) içine alınarak bulanıklık açısından standardize edilmiştir. Mikroorganizma içeren serum fizyolojinin bulanıklığı McFarland 0.5 standardı ile karşılaştırılmıştır.

Mc Farland No 0.5 standardının hazırlanması için; 0.0999 gr BaCl_2 tartılarak 10 mL dH_2O içinde çözülmüştür. Sonra, 100 mL 0.36 N H_2SO_4 (%1 v/v) çözeltisi hazırlanarak, BaCl_2 çözeltisinden 0.5 mL alınmış ve 0.36 N H_2SO_4 'den 99.5 mL ile karıştırılmıştır .

Mikroorganizma örneklerini 0.5 Mc Farland standardı ile standardize etmek amacıyla, öncelikle mikroorganizma kültürleri izole koloniler elde etmek için agar ortamında ekilmiş, 37°C 'de 24 saat inkübasyondan sonra iyi izole olmuş koloniler öze yardımıyla nutrient broth besiyeri yerine alınmıştır. Hazırlanan kültür 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, mikroorganizma kültüründen mikropipet yardımıyla belli oranlarda canlı hücre alınmış %0.9'luk serum fizyolojik üzerine eklenmiştir. Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonu, daha önce hazırlanmış olan 0.5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak süspansiyonun bulanıklığı ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland ile bulanıklığı ayarlanan mikroorganizma süspansiyonu tahmin olarak yaklaşık 1×10^7 - 1×10^8 cfu/mL aralığında canlı hücre içermesi gerekmiştir (Kirby ve Bauer 1966).

Bu yöntemle elde edilen süspansiyonun 0.5 McFarland ile karşılaştırılmasında şekil 3.1'de sunulan siyah beyaz çizgilerden oluşan bir kağıt kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Bakteri süspansiyonu ile McFarland standardını karşılaştırmak için kullanılmış kağıt

3.2.4.4 Besi yerlerin inokülasyonu ve disklerin yerleştirilmesi

İnokülasyon aşamasında hazırlanan ve standardize edilen mikroorganizma süspansiyonlarından 100 µL alınmış ve dragalski spatülü yardımıyla süspansiyon besiyerinin üzerine yayılmıştır (Ertürk vd. 2006). Mikroorganizma süspansiyonu yayılan petriler, bitki özütü içeren diskler yerleştirilmeden önce 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Özüt içeren diskler, inhibisyon zonlarının okunmasını engellemek amacıyla agar üzerinde aralıklarla dizilmiştir. Disk yerleştirilmesi işleminden 15 dakika sonra petriler 37 °C ve 24 saat inkübasyona alınmıştır.

3.2.4.5 İnhibisyon zonların ölçümü

İnhibisyon sürecinin sonunda oluşan inhibisyon zonları, cetvel yardımıyla bir uçtan diğer uca kadar ölçülmüş ve oluşan zonların çapı milimetre (mm) cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.4.6 Antimikrobiyal analizde kullanılan negatif ve pozitif kontrol

Negatif kontrol olarak DMSO ve %99'luk metanol disklerle emdirilerek kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise standart antibiyotik diskler kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotik disklerin listesi çizelge 3.4'de sunulmuştur.

Çizelge 3.4 Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin listesi

Antibiyotik Diski	Madde Miktarı
Ampisilin	10mg
Gentamisin	10mg
Streptomisin	10mg
Tetrasiklin	30mg

3.2.5 Bitki özütlerin Lowry metodu ile protein tayini

Bitki örneklerinden elde edilen özütlerin protein miktarı Lowry protein tayin metodu ile belirlenmiştir (Lowry vd. 1951). Alkalın ortamda bakır iyonu (Cu^{2+}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{1+} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tirozin (Tyr), Triptofan (Trp) ve Sistein (Cys) amino asitleri Folin reaktifinde bulunan fenol yapısını indirgeyerek mavi renk oluşumuna neden olurlar. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır ve 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Lowry metodunda, protein standardı olarak 1 mg/mL sığır serum albomin (BSA) çözeltisinden faydalanılmış ve 0.1-0.5 mg/mL aralığında BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca, bu metotta kullanılmış olan Lowry reaktifi; A (%2 Na_2CO_3 , 0.1N NaOH), B (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve C (%2 Na-K tartarat) tamponlarının sırayla 100:1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi ise 1:1 oranında distile su içerisinde hazırlanmıştır. Bitkilerden elde edilen özütlerin protein tayini için 0.5 mL Kör (sadece saf su), standart protein çözeltileri (BSA) ve bitki örnekleri içeren tüplere 2.5 mL Lowry reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüm deney tüplerine 0.25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüm solüsyonların 600 nm'de Kör'e karşı absorbans ölçümleri alınmıştır. Bitki özütlerinin protein miktarı, BSA konsantrasyonuna karşılık gelen OD_{600} değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplanmıştır.

3.2.6 Bitki özütlerin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik madde tayini spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotta Folin-Ciocalteu reaktifine ek olarak %2'lik sodyum karbonat çözeltisi ve fenolik madde standardı olarak da gallik asit (GA) kullanılmıştır. Oluşan reaksiyona bağlı renk değişimleri ise 750 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. Gallik asit (1 mg/mL) çözeltisinden 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 mg/mL aralığında DMSO ile hazırlanan çözeltiler fenolik madde standartları olarak kullanılmıştır. Fenolik madde miktarı tayini için 100 µl Kör (sadece DMSO), standard bileşik (GA) ve bitki özütü içeren tüplere

1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve iyice karıştırılan solüsyonlar oda ısısında karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda özütler, standart ve kör tüplerine 1 ml %2'lik sodyum karbonat eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra bu kez 1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, tüm solüsyonların 750 nm'de Kör'e karşı absorbans ölçümleri (OD_{750}) alınmıştır. Gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD_{750} değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam fenolik madde miktarları hesaplanmıştır (Slinkard ve Singleton 1977).

3.2.7 Bitki özütlerinin toplam flavanoid madde miktarının belirlenmesi

Bitki özütlerin toplam flavanoid madde miktarı alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Bu metotta %95'lik etil alkol, %10'luk alüminyum klorür ve 1 M sodyum asetat çözeltileri kullanılmıştır. Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi Woisky ve Salatino tarafından 1998 yılında modifiye edilmiştir. Bu metotta kuersetin, kalibrasyon eğrisini hazırlamak için kullanılmıştır. 10 mg kuersetin 10 mL %80'lik etil alkol içerisinde çözülmüş, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'ye seyreltilmiştir. Flavanoid madde tayini için tüpler içine 0.5 mL kör (%95'lik etil alkol), standart kuersetin solüsyonları ve bitki özütleri koyulmuş, üzerine 1.5 mL %95'lik etil alkol, 0.1 mL %10'luk alüminyum klorür, 0.1 mL sodyum asetat (1M) ve 2.8 mL DMSO ilave edilerek , 30 dakika karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, tüm solüsyonların 415 nm'de köre karşı absorbans ölçümleri (OD_{415}) alınmıştır. Kuersetin'in farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD_{415} değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam flavanoid madde miktarları hesaplanmıştır.

3.2.8 Toplam polifenol miktarına bağlı olarak bitki özütlerin doz plaka hazırlanması

Enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla, bitki özütlerinden elde edilen toplam polifenol madde miktarına bağlı olarak her bir bitki örneği için sekiz dozda özüt plakası hazırlanmıştır. Hazırlanan bu plakada, doz aralıkları en düşük doz 0.186 $\mu\text{g/mL}$ ve en yüksek 23.80 $\mu\text{g/mL}$ olmaktadır.

3.2.9 Sığır karaciğerden homojenat hazırlanması

Glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerinin tayini ile lipid peroksidasyon inhibisyon deneyinde sığır karaciğerinden elde edilmiş homojenat kullanılmıştır. Homojenat hazırlama işlemi 2 kez, 31 Ocak 2012 ve 16 Ekim 2012 tarihlerinde yapılmıştır. İzolasyon işlemi için -80 °C’de saklanmış olan sığır karaciğeri tartılarak, ağırlığının iki katı kadar, 0.15 M potasyum klorür, 1 mM EDTA ve 1 mM ditiyotritol içeren 10 mM’lık potasyum fosfat tamponu (pH=7.0) eklendikten sonra, homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 4 °C, 10,000 × g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan süpernatant alınıp başka tüplere konulmuş ve ikinci kez +4 °C, 30,000 × g’de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant enzim aktivite tayinlerinde kullanılmak amacıyla ependorflar içerisinde -80 °C’de saklanmıştır (Iscan vd. 1998).

3.2.10 Bitki özütlerinin Glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Özütlerin glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Habig tarafından geliştirilmiş metot, (Habig vd. 1974) modifiye edilmiş ve mikrolaka uygulamaları için minyatürleştirilmiştir (Isgor BS vd. 2005, Isgor BS vd. 2010). Reaksiyon, 5 µL bitki özütü, 33 µL 200 mM’lık fosfat tamponu (pH=6.5), 5 µL karaciğerden izole edilmiş GST enzimi (0.7826 mg/mL) ve 200 µL 50 mM’lık CDNB ve 200 mM’lık GSH içeren 100 mM fosfat tamponu ile 250 µL’lik toplam hacimde, 96 kuyulu mikrolakalarda 240 sn’de ve 340 nm dalga boyunda yürütülmüştür. Bitki özütleri 0.372 µg/mL - 23.81 µg/mL aralığında DMSO ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır. Bu özütlerinin enzim aktivitesine olan etkisi ise özüt yerine çözügen kullanılan köre karşılık farklı konsantrasyonlardaki özütlerin GST aktivitesine olan etkilerinin kıyaslanmasıyla belirlenmiştir. Deney tüm bitki örnekleri için duplike olarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL)=(OD_{340}/dakika)\times(1/\epsilon_{340})\times(\text{seyreltme faktörü})$$

$$\epsilon = \text{Sönümlleme Katsayısı CDNB için } 9,60 \text{ nM}^{-1}.\text{cm}^{-1} \text{ dır.}$$

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş, özütlerin % inhibisyon oranları ve bu oranlardan yola çıkarak da IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.11 Bitki özütlerinin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Bitki özütlerin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirtmek amacıyla GPx enzim aktivite tayini, glutatyon redüktaz (GR) içeren dolaylı ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksidin su ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüşümü ile açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'ın ne kadar NADPH molekülünün NADP'ye oksitlediği 340 nm'de takip edilmiştir (Isgor vd. 2008).

Tüm deneyler 96 kuyulu mikrolakada ve her bitki örneği için duplike olarak gerçekleştirilmiştir. Bitki özütleri 1.48 µg/mL - 23.81 µg/mL aralığında DMSO ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır. Özütlerin GPx enzim aktivitesine olan etkilerinin tespiti için her bitki örneğine karşılık Kör ve enzim kontrolü hazırlanmıştır. 5 µL Kör, enzim kontrolü (sadece DMSO) ve bitki örneği içeren kuyulara sırayla 36 µL 0.5 mM'lık EDTA içeren Tris.HCl (pH=8.0) tamponu, 2 µL sıgır karaciğer dokusundan elde edilen sitozol (0.9282 mg/mL) (enzim kontrolü hariç), 5 µL glutatyon redüktaz (20 U/mL) enzimi, 20 µL 20 mM'lık GSH, 5 µL 10 mM'lık NADPH çözeltisi ve en son 120 µL 30 mM'lık kumilhidroperoksit içeren Tris.HCl tamponu eklenerek karışımın toplam hacmi 200 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım karıştırıldıktan hemen sonra 340 nm'de optik dansitedeki (OD₃₄₀) düşüş, 5 dakika süresince takibe alınmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

$$EA \text{ (IU/mL)} = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/e_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

NADPH için 340 nm'deki sönümlleme katsayısı (e_{340}) 0,00622 nM⁻¹.cm⁻¹ olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş, özütlerin yüzde (%) inhibisyon oranları ve bu oranlardan yola çıkılarak da IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.12 Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla katalaz aktivite tayini, bu enzimin hidrojen peroksiti suya katalizlediği reaksiyonun spektrofotometrik olarak 520 nm’de okunup, peroksit miktarındaki düşmeye bağlı olarak görülecek absorpsiyondaki azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir (Aebi 1984, Isgor vd. 2008).

Deney iki aşamalı olup tamamı 96 kuyulu mikro plakalarda yapılmıştır. İlk aşamada her bitki özütünden 2 µL oranında alınmış ve mikrolaka kuyucuklarına konulmuştur. Bitki özütleri 0.372 µg/mL - 23.81 µg/mL aralığında DMSO ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır. Sonra, Kör ve özüt içeren kuyulara sırasıyla 100.1 U/mL katalaz enziminden 20µL, 50 mM’lık fosfat tamponundan 28µL ve 10 mM’lık H₂O₂ çözeltisinden 50 µL eklenerek 2 dakika inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrası karışıma 50 µL 15 mM’lık sodyum azit (NaN₃) ilave edilmiş ve 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İkinci inkübasyondan sonra, yani deneyin ikinci aşamasında, her karışımdan 5’er µL örnek alınmış ve yan kolondaki kuyulara konulmuş, ve bunlara 255 µL kromojen karışımı eklenerek, toplam hacim 260 µL’ye tamamlanmıştır. Kromojen karışımı aynı günde kullanmak amacıyla 4-aminoantipirin (4-AP), sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS) ve horseraddish peroksidaz (HRP) enziminden (1mL:1mL:1µL) oluşturularak hazırlanmıştır.

Karışım iyice karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, ortamda kalan H₂O₂ ile kromojen arasında oluşan reaksiyonda ortaya çıkan pembe renk 520 nm dalga boyunda mikrolakada okunmuştur. Bu işlemler her bitki özütü için ayrı ayrı ve dublike olarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıda sunulan formüle yerleştirilerek hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL) = (\Delta H_2O_2/dakika) \times (seyreltme faktörü) / \text{deney hacimi}$$

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş, özütlerin % inhibisyon oranları ve bu oranlardan yola çıkılarak da IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.13 Bitki özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Bitki özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Geller ve Wing (1984) tarafından geliştirilmiş metot, tarafımızdan kısmen değiştirilmiş ve mikropilaya uygulamaları için minyatürize edilmiştir.

SOD enzim aktivitesinin tayini amacıyla 0.3 mM ksantin, 25 mM nitro blue tetrazolyum (NBT) ve ksantin oksidaz içeren ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşmuş süperoksit radikalleri, SOD enzim sisteminde kullanılmadığında ortamda bulunan NBT bileşiğinin redüksiyonuna ve ortamda renk değişimine neden olmuştur.

Özütlerin SOD enzim aktivitesine olan etkilerinin tespiti için her bitki örneğine karşılık Kör ve enzim kontrolü hazırlanmıştır. 5 µL Kör, enzim kontrolü (sadece DMSO) ve özüt içeren kuyuların üzerine sırayla 5 µL sitozol (0.9282 mg/mL), 150 µL 0.6 mM'lık EDTA içeren sodyum karbonat (Na₂CO₃) tamponu (200 mM; pH=10.0), 75 µL ksantin (0.3 mM), 10 µL suyla hazırlanan NBT karışımı ve 0.139 U/mL XOD enziminden 5 µL eklenmiştir. Sonra karışım iyice karıştırıldıktan sonra kuyuların içinde oluşan reaksiyonlar 550 nm dalga boyunda takibe alınmıştır. Deneyde yapılan tüm işlemler her bitki örneği için duplike olarak yapılmıştır. Bitki özütleri 0.372 µg/mL – 11.90 µg/mL aralığında DMSO ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır. Deneyde yapılan tüm işlemler her bitki örneği için dublike olarak yapılmıştır. Deney sonunda, elde edilen veriler aşağıda belirtilen formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EA(U/mL) = (OD_{\text{kör}} - OD_{\text{test}}) / (OD_{\text{kör}}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş, özütlerin % inhibisyon oranları ve bu oranlardan yola çıkılarak da IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.14 Bitki özütlerinin TBARS yöntemi ile lipid peroksidasyonu üzerinde etkilerinin analizi

Oksijen radikalleri fosfolipitlerin yapılarında bulunan doymamış serbest yağ asitleri ile reaksiyona girerek, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna neden olmaktadır. Diğer taraftan yüksek ROT düzeyi lipid peroksidasyon ürünlerinin yıkımı sırasında düşük moleküler ağırlıklı aldehitlerin oluşumuna yol açmaktadır. Malondialdehit (MDA) bunlardan birisidir. Bu bileşikler ise tiyobarbitürik asit ile bileşikler oluşturma eğilimindedir. Dolayısıyla hücrel lipid peroksidasyonu düzeyinin belirlenmesinde tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren bileşik (MDA) düzeylerinin tayini hücrel oksidatif stres düzeyi hakkında bilgi vermektedir.

Lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla oksidatif stres seviyesinin tayini için lipid peroksidasyon düzeyinin tespiti ve bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi için Okhawa ve arkadaşlarının (1979) geliştirdiği metot kullanılmıştır. Bu metotta, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, asidik (pH=3.0-4.0) ve sıcak (95 °C) bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA-TBA kompleksini oluşturmuştur. Kompleksten oluşan pembe renk 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, 250 µL sıgır karaciğerden elde edilen sitozole (11.602 mg/mL), 50µL bitki özütü (5 doz) ekleyip toplam hacim distile su ile 500 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrası; sırasıyla, 400 µL % 15'lik trikloro asetik asit (TCA), 20µL % 0.01 butil hidroksi toluen (BHT) ve 80 µL % 0.67'lik TBA eklenip ve 30 dakika kaynar suda kaynamaya bırakılmıştır. Kaynama sonrası, tüplerdeki karışıma 1.5 mL Butan-1-ol eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra tüpler 6000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, oluşan süpernatant alınıp, oluşan pembe renk 532 nm'de Köre karşı

spektrofotometrik olarak okunmuştur. Deneyde yapılan tüm işlemler her bitki örneği için dublike olarak yapılmıştır. Bitki özütleri 1.48 µg/mL - 23.81 µg/mL aralığında DMSO ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır.

Bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkisi, aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır :

$$TBARS = [(OD_{\text{numune}}) - (OD_{\text{kör}}) / KEE (nM^{-1})] \times (SF) = nM \text{ MDA Eq}$$

KEE: Kalibrasyon Eğrisi Eğimi; SF: seyreltme faktörü; Eq: Ekuvalan

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş, özütlerin % inhibisyon oranları ve bu oranlardan yola çıkılarak da IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.15 Bitki özütlerin insan hücre serilerinin üzerinde olan etkileri

3.2.15.1 İnsan hücre serilerinin canlılığının sürdürülmesi

İnsan hücre serileri HL- 60 (İnsan akut promiyelositik lösemi) ve MCF-7 (meme kanseri) hücreleri T-25 kültür kabında 1×10⁶ hücre/mL yoğunlukta, 10mL besiyeri içerisinde ŞAP Enistitüsünden temin edilmiştir. Hücre serileri standard protokollerin (Gil vd. 1998, İşgör vd. 2013) uygulanmasıyla destekli besiyerlerinde (2mM L-Glutamin, 100 Unite/mL Penisilin-Streptomisin ve %10 Fetal Sığır Serum içeren RPMI 1640 ve DMEM) yüzey alanı 25 (T-25) ve 150 cm² (T150) olan filtre kapaklı hücre kültür kaplarında büyütülmek üzere %5 CO₂ ve nem desteği sağlanmış incubatörde 37 °C'da aseptik şartlarda büyütülmüştür. Hücrelerin duplikasyon sürelerine bağlı olarak besiyerleri değiştirilmiş ve her 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna bağlı olarak pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasajlama ve yeni hücre ekim basamaklarında hücreler steril salin-fosfat tamponu (PBS) ve ardından katkısız besiyerleri ile yıkanmış, santrifuj işlemi 5 dakika düşük hızda (450×g) steril falkon

tüpler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin dublikasyon süreleri ve yoğunlukları rutin olarak tripan mavisi boya dışlama metodu ile belirlenmiştir.

3.2.15.2 Tripan mavi metodu ile kanser hücrelerin sayımı

HL-60 ve MCF-7 hücrelerinin canlılığı ve yoğunluğu tripan mavi boyama dışlama metodu ile yapılmıştır. Bu metotta 100 µL hücre süspansiyonu steril şartlarda kültür kabından alınarak, steril olmayan 1.5 mL hacimli ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu hücre süspansiyonundan alınan her 20 µL'ye 40µL PBS ile seyreltilmiş % 0.4'lük tripan mavisi çözeltisi eklenmiş ve hemasitrometre lamina yardımı ile hücre sayımları mikroskop altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.15.3 XTT metodu ile özütlerin kanser hücresi üzerine olan sitotoksik etkilerinin analizi

Bitki özütlerinin kanserli hücre modelleri (HL-60 ve MCF-7) üzerinde etkilerini analiz etmek amacıyla kolorimetrik bir yöntem olarak tanınan XTT metodu kullanılmıştır. Bu metotta, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil-2-tetrazolium-5-karboksianilid) gibi tetrazolium tuzu kullanılmıştır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolium tuzu (sarı renk) kullanarak formazan (turuncu) boya üretmesi sonucu oluşan rengin 450 nm'de mikropilaka okuyucuda kolorimetrik olarak takibe alınmasıdır (Berridge vd. 2005).

Bu yöntemde, 96 kuyucuklu hücre plakalarına 145 µL hücre süspansiyonu (her bir kuyuda 1×10^4 kanser hücresi olacak şekilde) eklenmiştir ve 24 saat içerisinde hücrelerin yüzeye yapışmaları için beklenmiştir. Bu süre sonunda hücreler invert mikroskop ile kontrol edildikten sonra bitkilerin metanol özütlerinden 5 µL olacak şekilde MCF-7 ve HL-60 kanser hücre hatlarına ilave edilerek 24 saat boyunca inkübasyona alınmıştır. Bitki özütlerinin en düşük dozu 0.372 µg/mL ve en yüksek dozu 23.81 µg/mL olmak üzere stok çözeltileri 1:2 oranında DMSO kullanılarak seri seyreltmeyle hazırlanmıştır. Uygulama yapılmamış hücreler çalışmada kontrol olarak kullanılmıştır. Inkübasyon sonrası, 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil-2-tetrazolium-5 karboksi-anilid) boyası

(50 mg/ml PBS çözeltisinde hazırlandı) 50 µL oranında 4 saat boyunca 37°C de hücreler ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı mitokondriden türevlenen aktiviteye bağlı olarak formazan ürünleri olan turuncu rengin oluşumunun 450 nm’de mikropilaka okuyucuda kolorimetrik olarak okuması ile gerçekleştirilmiştir (Marshall vd. 1999).

4. BULGULAR

4.1 Bitki Özütlerin Verimleri

Centaurea virgata, *Cichorium intybus*, *Euphorbia macroclada*, *Melilotus officinalis* ve *Zygophyllum fabago* türlerinden elde edilen metanollü özütlerin % verimleri çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bitki özütlerin (%) verimleri

Bitki Familyası	Bitki Adı	Bitki Kısımları	Verim (%)
Asteraceae	<i>Centaurea virgata</i> Lam.	Çiçek	7.125
	<i>Cichorium intybus</i> L.	Çiçek	7.965
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	Çiçek	6.285
		yaprak	13.76
Fabaceae	<i>Melilotus officinalis</i> (L.)Pall.	Çiçek	7.55
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum fabago</i> L.	Yaprak	8.62
		Meyve	19.535

Özütleme çalışmaları sonucunda en yüksek verim *Zygophyllum fabago*’nun meyvesinden ve *Euphorbia macroclada*’nın yaprağından elde edilmiştir. En az verim ise *Euphorbia macroclada*’nın çiçeğinden elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

4.2 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

4.2.1 Disk difüzyon yöntemi ile pozitif ve negatif kontrollerin sonuçları

Antibiyotiklerden; Ampisilin, Gentamisin, Streptomisin ve Tetrasiklin pozitif kontrol olarak (Çizelge 4.2), DMSO ve metanol ise negatif kontrol olarak disk difüzyon yönteminde standart bakteri suşlarına karşı test edilmiştir. Negatif kontrol olarak

kullanılan DMSO ve metanolün hiç bir mikroorganizma suşu üzerinde inhibisyon etkisi görülmemiştir.

4.2.2 Bitki özütlerinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları

Bitki örneklerinden elde edilen metanollü özütlerin disk difüzyon yöntemi ile mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği inhibisyon etkileri çizelge 4.2’de verilmiştir. *C.virgata*, *M.officinalis* ve *C.intybus*’un çiçeğinden, *Z.fabago*’nun yaprağı ve meyvesinden ve *E.macroclada*’nın çiçeğinden ve yaprağından elde edilen metanollü özütlerin antimikrobiyal aktivitesi, 2 adet Gram (+) (*B. subtilis* ve *S. aureus*), 2 adet Gram (-) (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) bakterileri ile bir adet maya (*C. albicans*) suşu olmak üzere toplam 5 adet mikroorganizma üzerinde incelenmiştir. Sonuçlara göre her bir bitki özütü en az bir mikroorganizma suşu üzerinde inhibisyon etki göstermiştir. *C. virgata* çiçeğinden elde edilen özüt; *S. aureus* (ATCC 25923), *B. subtilis* (ATCC 6633), *E. coli* (ATCC 25922) ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853) suşları üzerinde 15 mm ile 18 mm arasında zon çapı oluşturarak en etkili özüt olmuştur. Ayrıca, *Z. fabago*’nun yaprağından elde edilen metanollü özüt tüm gram negatif ve gram positif suşları üzerinde 7 mm ile 12 mm arasında zon çapı oluşturarak ikinci yüksek aktiviteyi gösteren özüt olarak belirlenmiştir. En düşük antimikrobiyal aktivite *M. officinalis*’in çiçeğinden hazırlanan özütte gözlenmiştir. *M. Officinalis*’in çiçeğinden elde edilen özüt sadece *S. aeurus* (ATCC 25923) üzerinde 10 mm’lik zon oluşturarak, antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca, antimikrobiyal çalışmas sırasında kullanılan tek maya suşu olan *C. albicans* (ATCC 10231) tüm bitki özütlerine karşı direnç göstermiştir.

Çizelge 4.2 Bitki özütlerin antimikrobiyal aktivite sonuçları

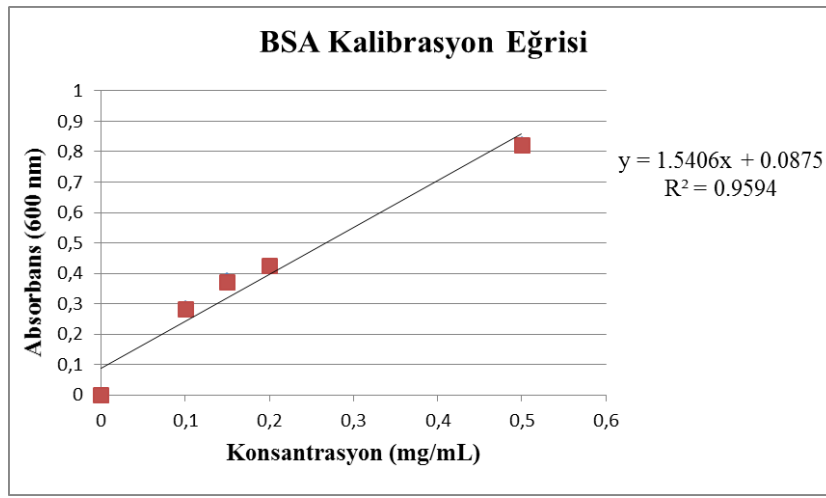
Bitki Örnekleri		Mikroorganizmalar				
Bitki Adı	Bitki Kısım	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
		İnhibisyon Zon Çapı (mm) *				
<i>C. virgata</i>	Çiçek	18	-	18	15	16
<i>C. intybus</i>	Çiçek	10	-	11	-	8
<i>E. macroclada</i>	Çiçek	11	-	10	-	9
	Yaprak	12	-	-	-	-
<i>M. officinalis</i>	Çiçek	-	-	-	-	10
<i>Z. fabago</i>	Meyve	9	-	10	7	12
	Yaprak	-	-	9	-	11
Pozitif Kontrol						
Ampisilin		30	-	20	-	20
Gentamisin		18	-	-	15	30
Stroptomisin		25	-	23	15	20
Tetrasiklin		13	-	35	20	13

*Zon çapları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülmüştür

4.3 Bitki Özütlerin Toplam Protein Tayini

4.3.1 Kalibrasyon eğrisi

Bitki özütlerinin toplam protein miktarı Lowry yöntemine göre çizilmiş, kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için sığır serum albumin (BSA)'dan hazırlanmış, farklı konsantrasyonlarda solüsyonlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Toplam protein tayini için BSA standart eğrisi grafiği

4.3.2 Bitki özütlerinin protein miktarı

Tez çalışmasında kullanılan bitkilerden elde edilen metanollü özütlerin protein miktarları Lowry yöntemine göre belirlenmiştir. Elde edilen veriler çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3 Bitki özütlerinin toplam protein miktarı

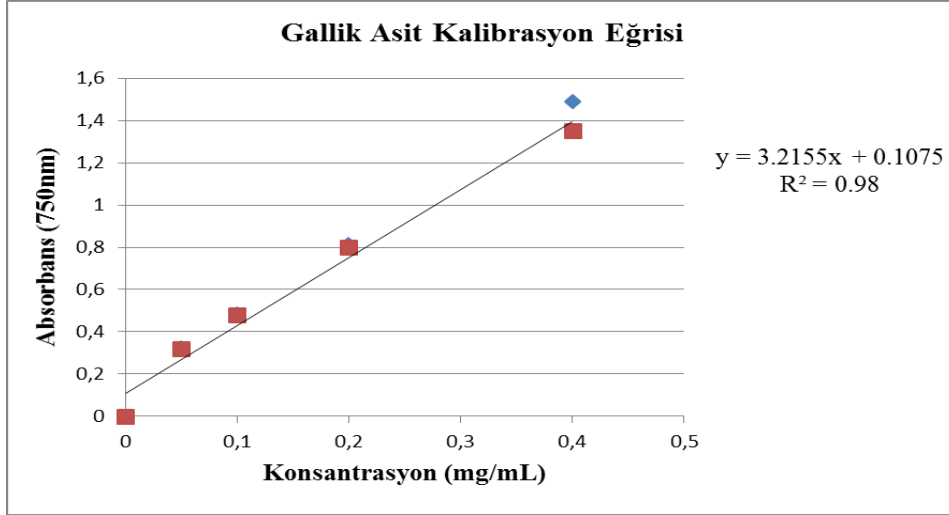
Bitki Adı	Bitki Kısımları	Protein Miktarı (mg/mL)
<i>Centaurea virgata</i>	Çiçek	17.18
<i>Cichorium intybus</i>	Çiçek	16.59
<i>Euphorbia macroclada</i>	Çiçek	18.66
	Yaprak	48.99
<i>Melilotus officinalis</i>	Çiçek	7.33
<i>Zygophyllum fabago</i>	Yaprak	16.50
	Meyve	9.15

Gözlemlenen sonuçlara göre, *E. macroclada*'nın yaprağından elde edilen özüt 48.99 mg/mL oranında içerdiği protein miktarı ile en yüksek ve *M. officinalis* çiçeği 7.33 mg/mL oranında içerdiği protein miktarı ile en düşük protein içerikli özüt olarak belirlenmiştir.

4.4 Bitkilerin Toplam Fenolik Madde Tayini

4.4.1 Kalibrasyon eğrisi

Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi Folin-Ciocalteu (FCR) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile bitki özütlerinin toplam fenolik madde içeriklerinin tayini için çizilen kalibrasyon eğrisinde standart olarak farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için gallik asit (GA)'dan hazırlanmış, farklı konsantrasyonlarda solüsyonlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart eğrisi grafiği

4.4.2 Bitkilerin toplam fenolik madde miktarı

Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarları şekil 4.2'deki kalibrasyon eğrisi yardımı ile hesaplanmış ve elde edilen deneysel veriler çizelge 4.4'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre *E. macroclada*'nın yaprağının en yüksek, *M. officinalis*'in çiçeğinin ise en düşük fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmüştür.

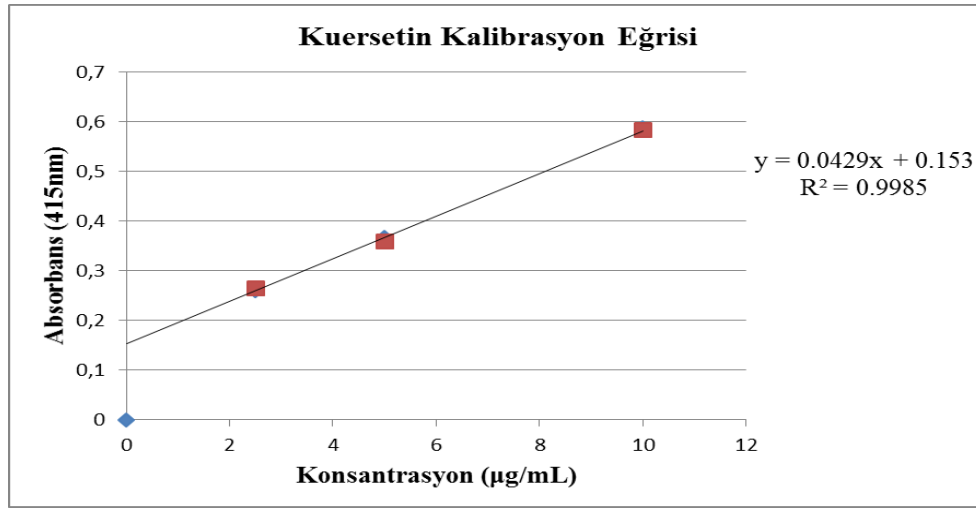
Çizelge 4.4 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarı

Bitki Adı	Bitki Kısımları	Fenolik madde Miktarı (mg/mL)
<i>Centaurea virgata</i>	Çiçek	93.89
<i>Cichorium intybus</i>	Çiçek	117.67
<i>Euphorbia macroclada</i>	Çiçek	143.64
	Yaprak	573.10
<i>Melilotus officinalis</i>	Çiçek	44.01
<i>Zygophyllum fabago</i>	Yaprak	114.13
	Meyve	48.40

4.5 Bitki Özütlerinin Toplam Flavonoid Madde Tayini

4.5.1 Kalibrasyon eğrisi

Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde tayini alüminyum klorür klorometrik yöntemi ile belirlenmiştir. Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde tayini için çizilen kalibrasyon eğrisinde, belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış standart kuersetin çözeltilerinden elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi grafiği şekil 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.3 Toplam flavonoid madde tayini için kuersetin standart eğrisi grafiği

4.5.2 Bitkilerin toplam flavonoid madde miktarı

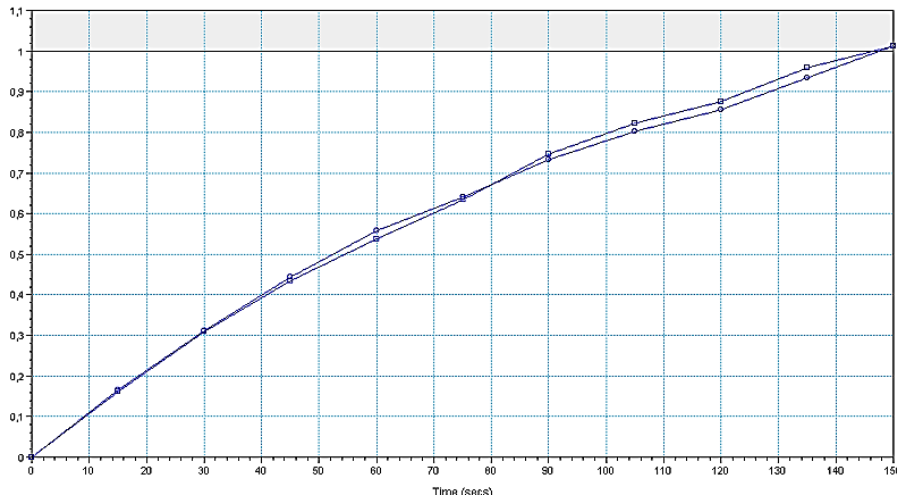
Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları şekil 4.3'deki kalibrasyon eğrisi grafiği yardımıyla hesaplanmış ve elde edilen deneysel veriler çizelge 4.5'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre *E. macroclada*'nın yaprağının en yüksek, *Z. Fabagu*'nun meyvesinin ise en düşük flavonoid madde miktarına sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı

Bitki Adı	Bitki Kısımları	Flavonoid madde Miktarı (µg/mL)
<i>Centaurea virgata</i>	Çiçek	122.81
<i>Cichorium intybus</i>	Çiçek	94.23
<i>Euphorbia macroclada</i>	Çiçek	97.63
	Yaprak	450.70
<i>Melilotus officinalis</i>	Çiçek	55.89
<i>Zygophyllum fabago</i>	Yaprak	181.47
	Meyve	28.96

4.6 Bitki Özütlerinin Glutatyon-S-Transferaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

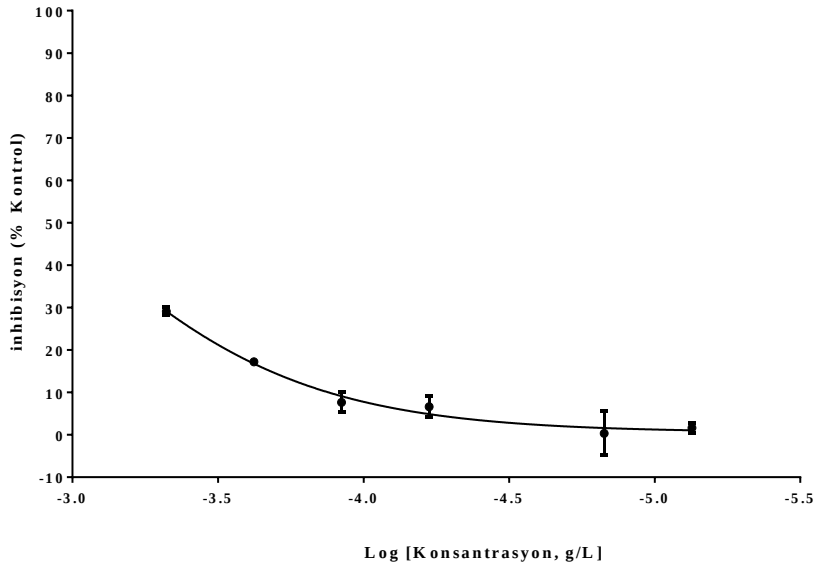
Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan GST enziminin aktivitesi, 340 nm’de CDNB-GSH konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak ölçülmüştür. Bitki özütleri olmadan, sadece GST enziminin oluşturduğu aktivite değerleri 0.7826 mg/mL enzim için 1.721 µmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GST enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak belirlenmiştir. GST enzim aktivite eğrisi şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 GST enzim aktivite eğrisi (Spektrometreden alınan aktivite eğrisi)

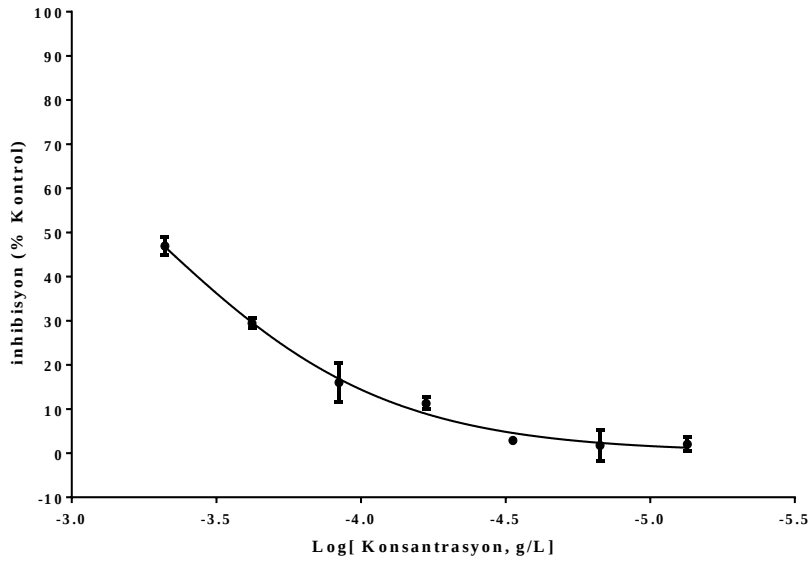
GST enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra; *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis* bitkilerinin çiçekleri, *E. macroclada* bitki yaprağı ve çiçeği ve *Z. fabago* bitki yaprağı ve meyve özütlerinin GST enzim aktivitesine olan etkileri çalışılmıştır. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevap eğrilerine ait grafikler şekil 4.5 - 4.12’de gösterilmiştir.

Şekil 4.5’te *C. virgata* bitki çiçeğinden elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında en fazla %30 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



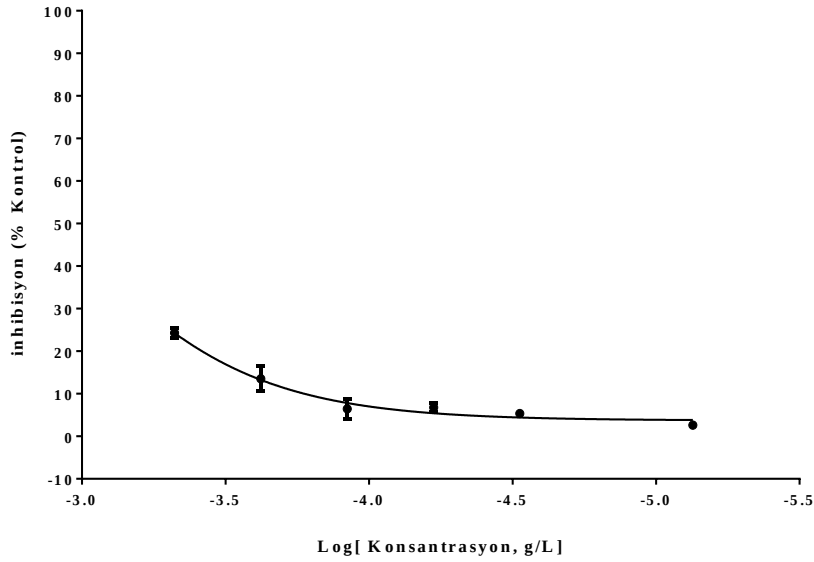
Şekil 4.5 *C. virgata* Lam. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

C. intybus bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisinin ve IC_{50} değerinin (Şekil 4.6) gözlenmesi bu bitki çiçeğinin %50 inhibisyon oranıyla iyi GST inhibitörü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, IC_{50} değeri ise, 0.334 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

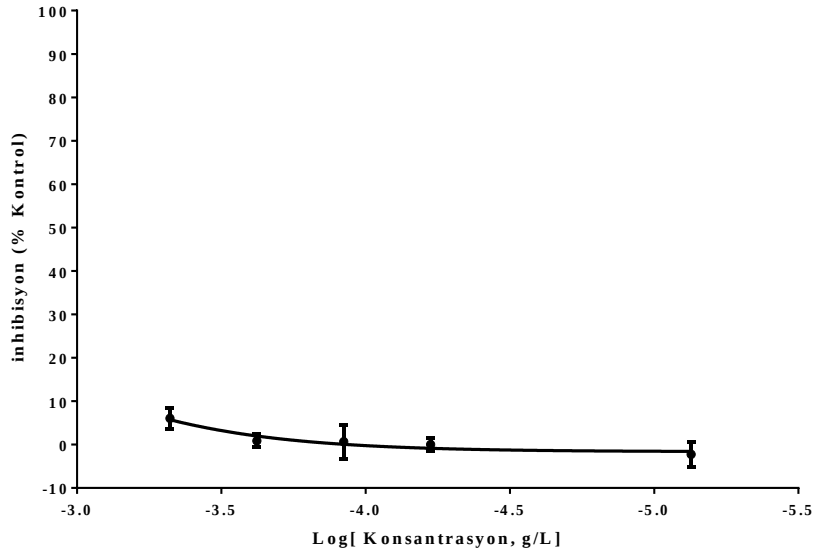


Şekil 4.6 *C. intybus* L. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (IC₅₀ değeri 0.334 µg/mL)

Şekil 4.7 ve 4.8’de *E. macroclada* bitki çiçeği ve yaprağından elde edilen özütlerin en yüksek dozu kullanıldığında sırasıyla en fazla %22 ve %10 inhibisyon yaptığı görülmektedir.

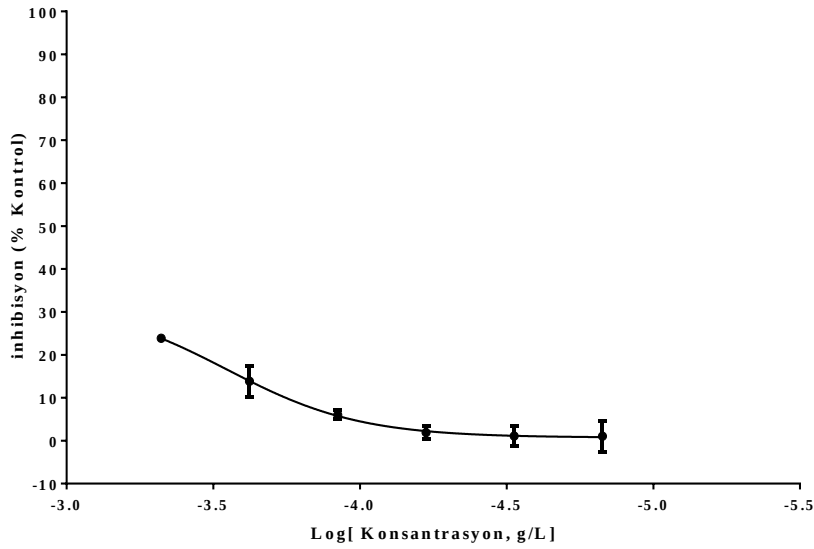


Şekil 4.7 *E. macroclada* Boiss. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



Şekil 4.8 *E. macroclada* Boiss. bitki yaprağı özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

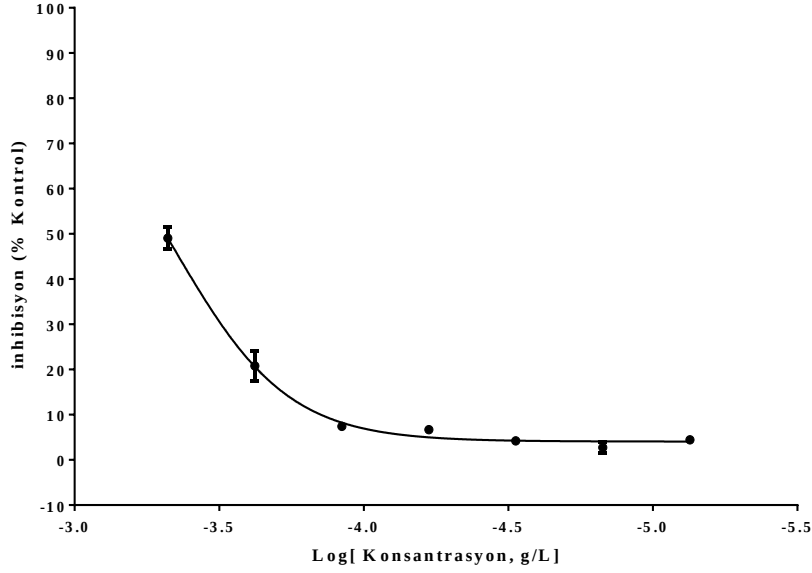
M. officinalis bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.9) bu bitki özütünün en yüksek dozda en fazla %23 oranında GST enzimi inhibisyonu yaptığını göstermektedir.



Şekil 4.9 *M. officinalis* (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

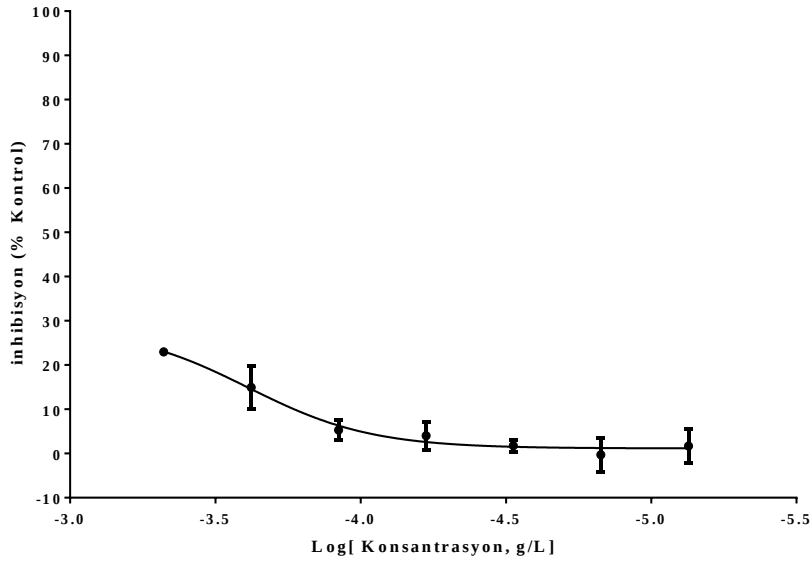
Şekil 4.10'da değişen doz aralıklarındaki inhibitör etkileri ve IC_{50} değeri incelendiğinde en yüksek dozda gözlenen GST enzim inhibisyonu %50 olmaktadır. Bu inhibisyon farkı

Z. fabago bitki meyvesi özütünün iyi bir inhibitör etkinliği olduğunu göstermektedir. IC_{50} değeri, 0.447 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

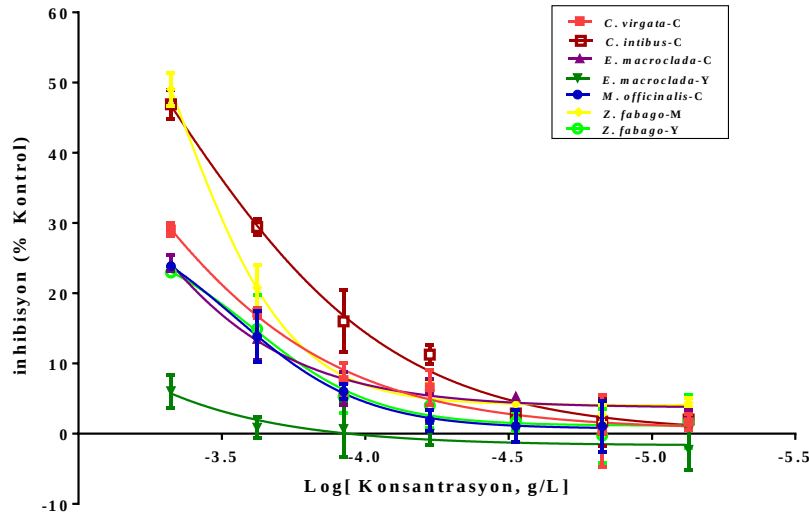


Şekil 4.10 *Z. fabago* L. bitki meyvesi özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (IC_{50} değeri 0.447 $\mu\text{g/mL}$)

Şekil 4.11 de *Z. fabago* bitki yaprağından elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında bile en fazla %20 inhibisyon yaptığı görülmektedir .



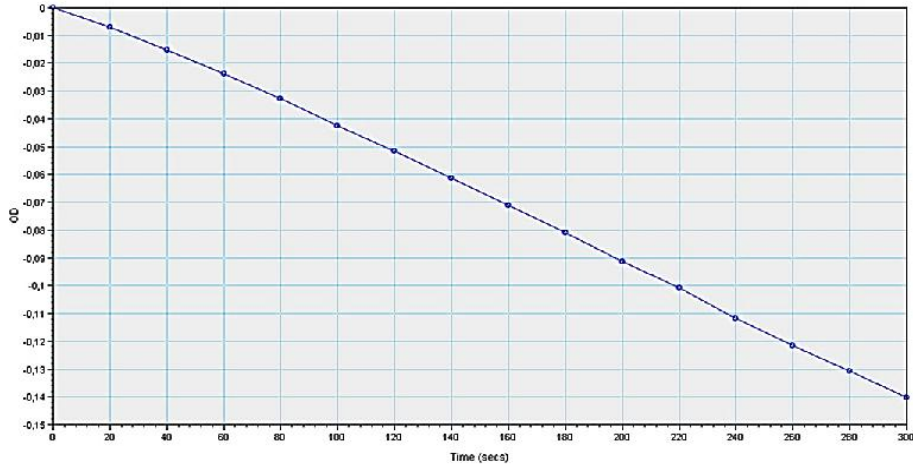
Şekil 4.11 *Z. fabago* L. bitki yaprağı özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



Şekil 4.12 Bitki özütlerinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.7 Bitki Özütlerinin Glutatyon Peroksidaz Enzimi Üzerine Olan Etkileri

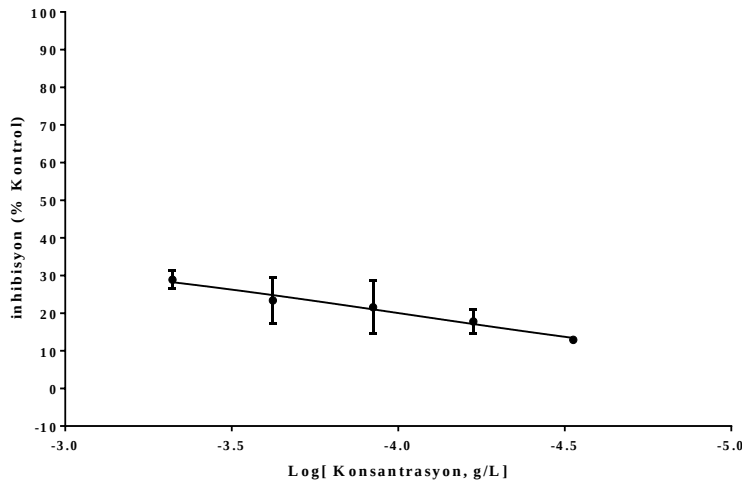
Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan GPx enzim aktivitesini belirlemek amacıyla GPx enzim aktivite tayini, glutatyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksitin, suya ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşü sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'ın NADPH molekülünün NADP'ye oksidasyonu 340 nm'de takibe alınmıştır. Bitki özütleri olmadan, yani sadece GPx enziminin oluşturduğu aktivite değeri 0.928 mg/mL enzim için 0.045 mmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak belirlenmiştir. GPx enzim aktivite eğrisi şekil 4.13'te sunulmuştur.



Şekil 4.13 GPx enzim aktivite eğrisi (Spektrometreden alınan aktivite eğrisi)

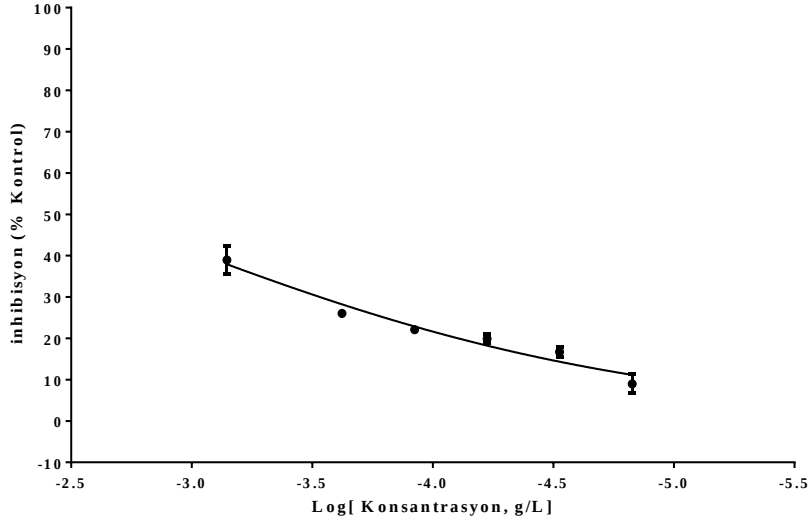
GPx enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis* bitki çiçeği; *E. macroclada* bitki yaprağı ve çiçeği, *Z. fabago* bitki yaprağı ve meyve özütlerinin GPx enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevap grafikleri Şekil 4.14 - 4.21’de gösterilmiştir.

C. virgata bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.14) incelendiğinde, en yüksek ve en düşük dozlarda sırayla %30 ve %10 GPx enzimi inhibisyonuna yol açtığını, bu da *C. virgata* bitki çiçeği özütünün en fazla % 20 GPx enzimi inhibisyonu yaptığını göstermektedir.



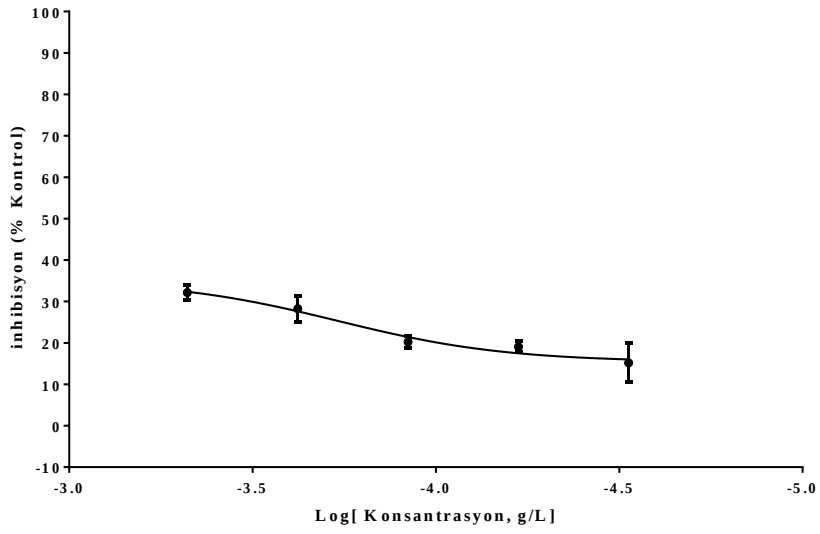
Şekil 4.14 *C. virgata* Lam. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.15'te değişen doz aralıklarındaki inhibitör etkileri incelendiğinde en yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen GPx enzimi inhibisyonu sırayla %40 ve %10'dur. Dolayısıyla bu da *C. intybus* bitki çiçeği özütünün %30 inhibisyon yaptığını göstermektedir.

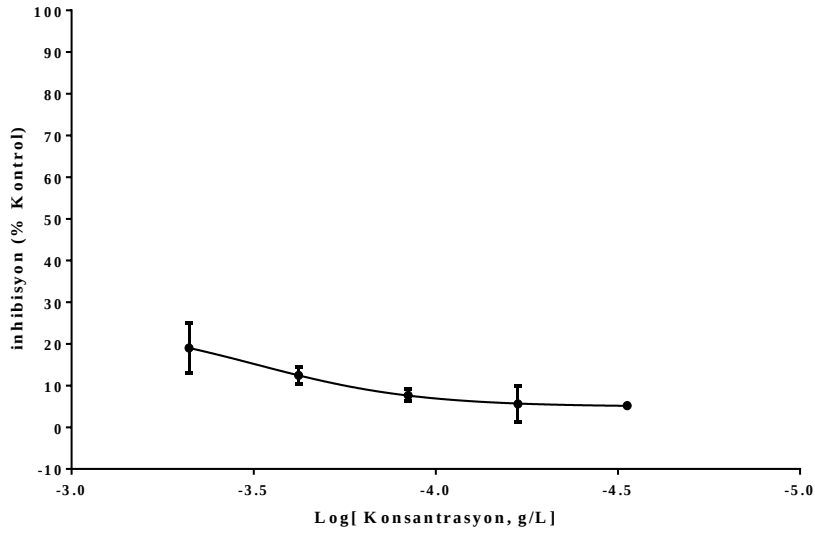


Şekil 4.15 *C. intybus* L. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.16 ve 4.17'de *E. macroclada* bitki çiçeği ve yaprağından elde edilen özütlerin en yüksek dozu kullanıldığında sırasıyla en fazla %30 ve %20 inhibisyon yaptığı görülmektedir.

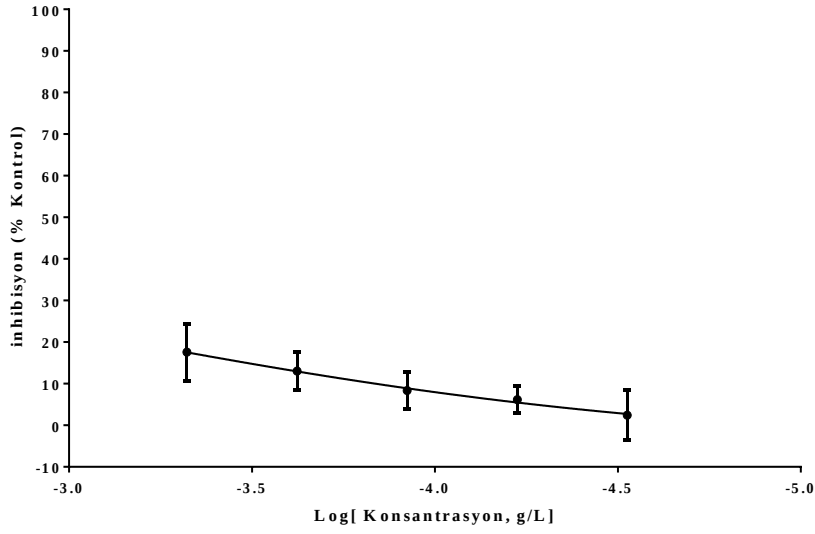


Şekil 4.16 *E. macroclada* Boiss. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



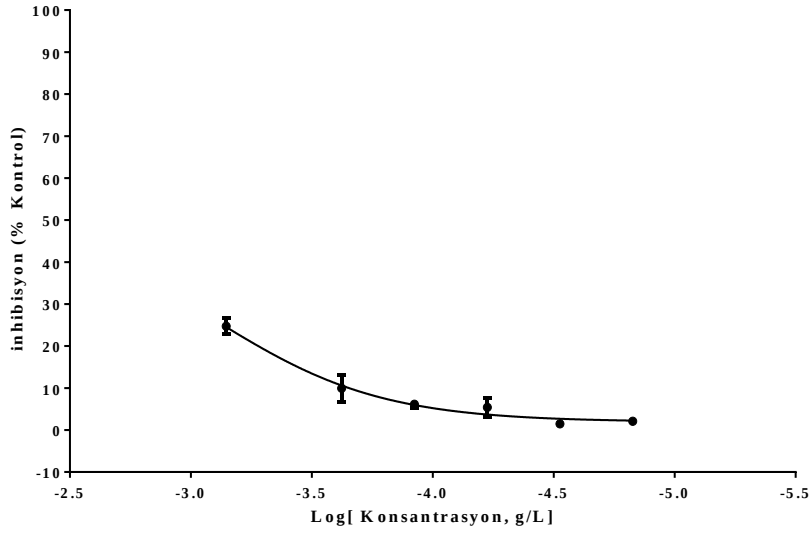
Şekil 4.17 *E. macroclada* Boiss. bitki yaprağı özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.18’de *M. officinalis* bitki çiçeğinden elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında bile yaklaşık olarak en fazla %16 inhibisyon yaptığı görülmektedir.

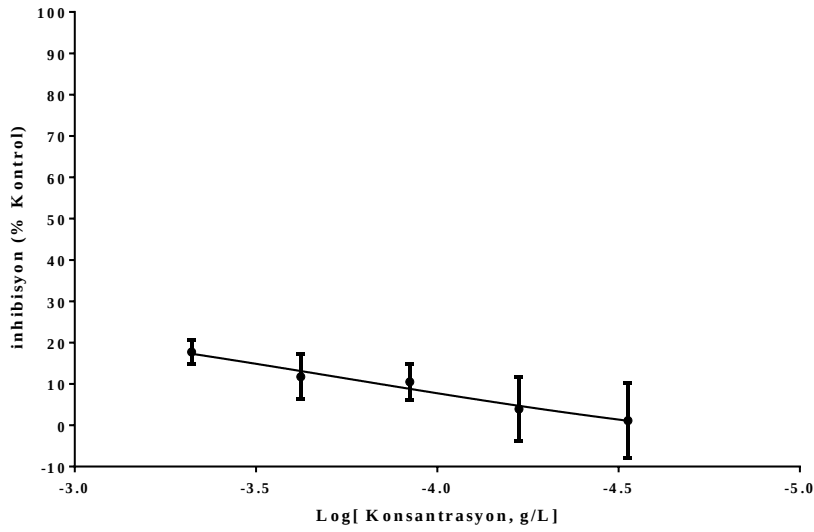


Şekil 4.18 *M. officinalis* (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

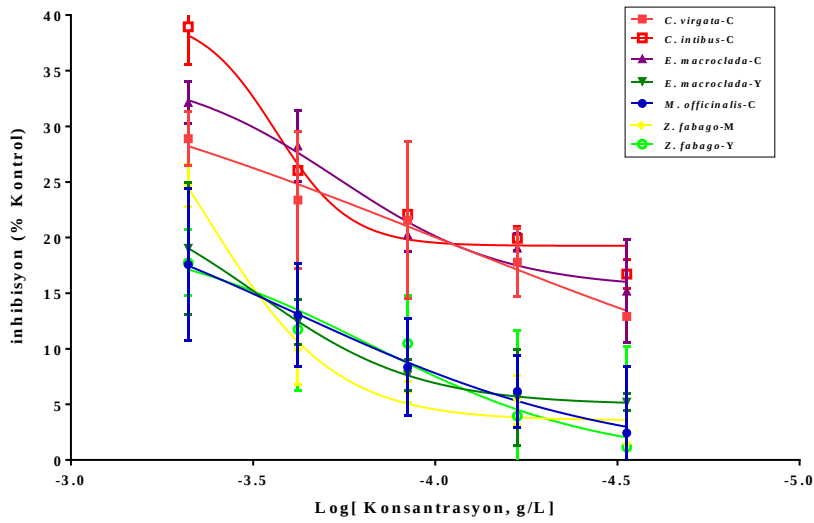
Şekil 4.19 ve 4.20’de *Z. fabago* bitki meyvesi ve yaprağından elde edilen özütlerin en yüksek dozu kullanıldığında sırasıyla en fazla %25 ve %18 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



Şekil 4.19 *Z. fabago* L. bitki meyve özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



Şekil 4.20 *Z. fabago* L. bitki yaprağı özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

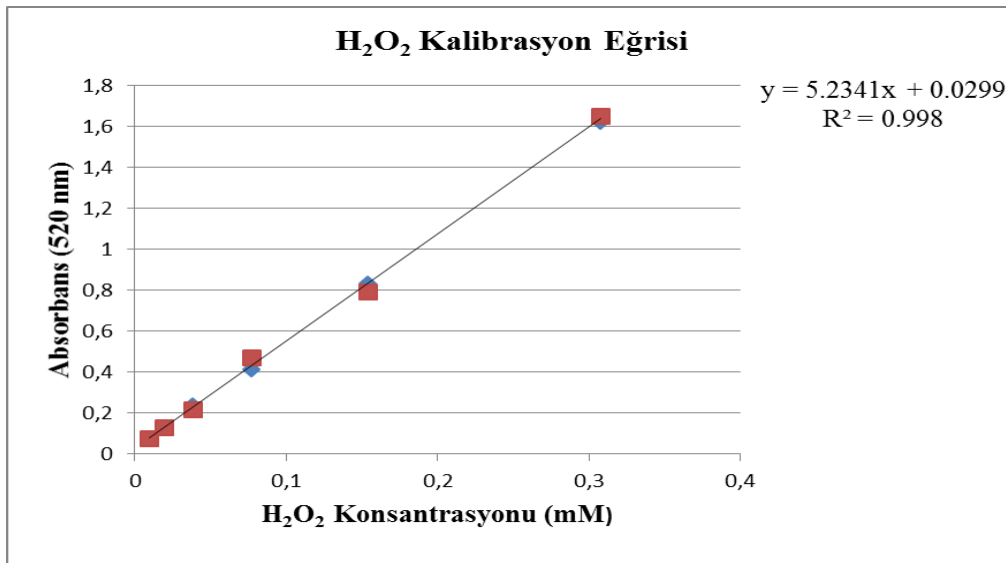


Şekil 4.21 Bitki özütlerinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.8 Bitki Özütlerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerinde olan etkilerini belirlemek amacıyla katalaz aktivite tayini yapılmıştır. Bu enzimin hidrojen peroksiti suya katalizlediği reaksiyon spektrofotometrik olarak 520 nm’de peroksit miktarındaki düşüşe bağlı olarak absorbsiyondaki görülen azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir.

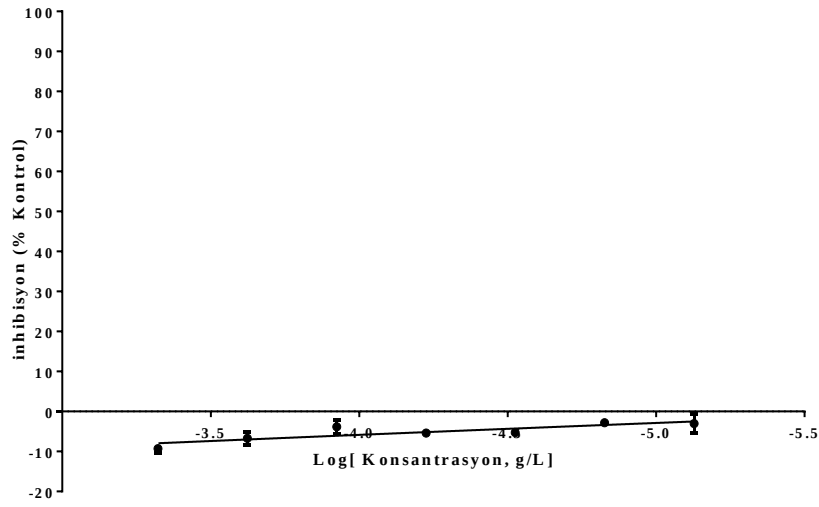
Bitki özütleri olmadan sadece KAT enziminin oluşturduğu aktivite değeri 4.53 mg/mL saf enzim için ölçülen 100.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin KAT enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak belirlenmiştir. KAT enziminin aktivitesi H_2O_2 kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için H_2O_2 den hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardan oluşan solüsyonlardan elde edilen absorbans değerlerine göre çizilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 H_2O_2 kalibrasyon eğrisi

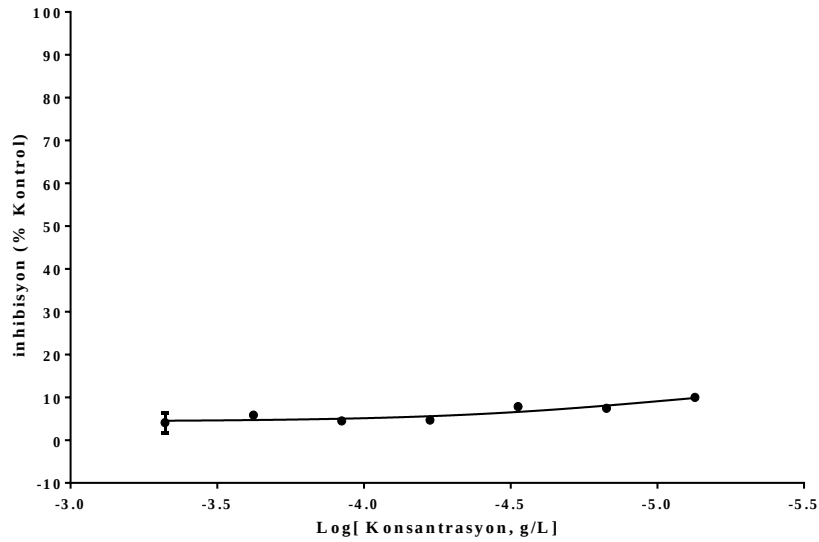
KAT enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra; *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis* bitkilerinin çiçekleri, *E. macroclada* bitkisinin yaprağı ve çiçeği ve *Z. fabago* bitkisinin yaprağı ve meyve özütlerinin KAT enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevap grafikleri şekil 4.23 - 4.30'de gösterilmiştir.

C.virgata bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.23) incelendiğinde, kullanılan dozların hiç birisinde KAT enzimi inhibisyonu görülmemektedir.



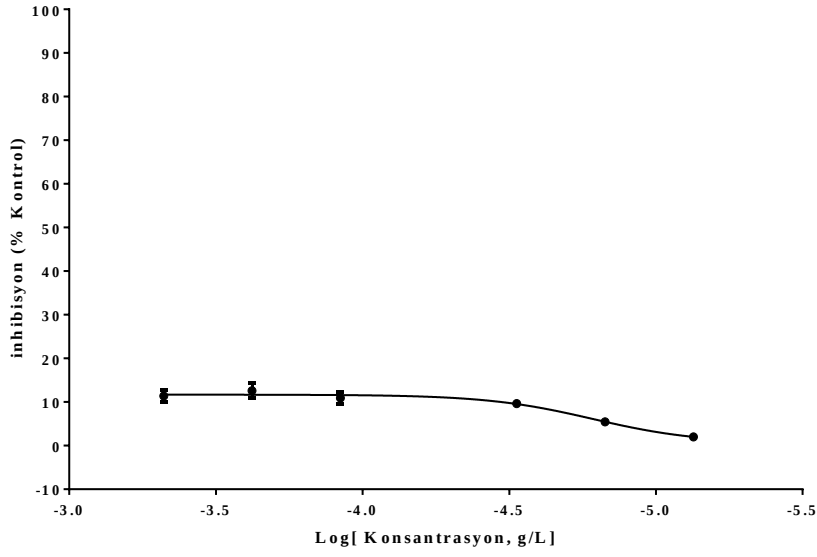
Şekil 4.23 *C. virgata* Lam. bitkisinin çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

C. intybus bitkisi çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.24) incelendiğinde, en yüksek ve en düşük dozlarda sırasıyla %5 ve %10 KAT enzimi inhibisyonu yapması, *C. intybus* bitkisi çiçeği özütünün, zayıf bir KAT enzimi inhibitörü olduğunu göstermektedir.



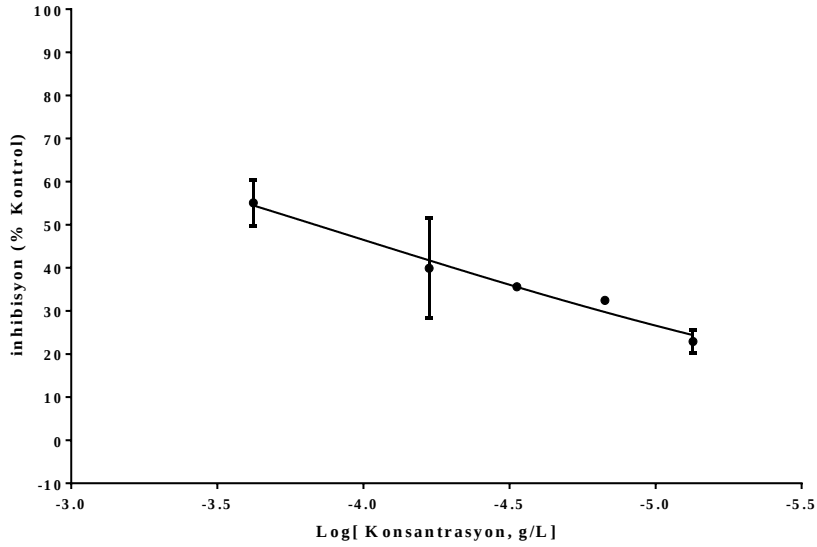
Şekil 4.24 *C. intybus* L. bitkisi çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.25'te *E. macroclada* bitkisi çiçeğinden elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında bile en fazla %10 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



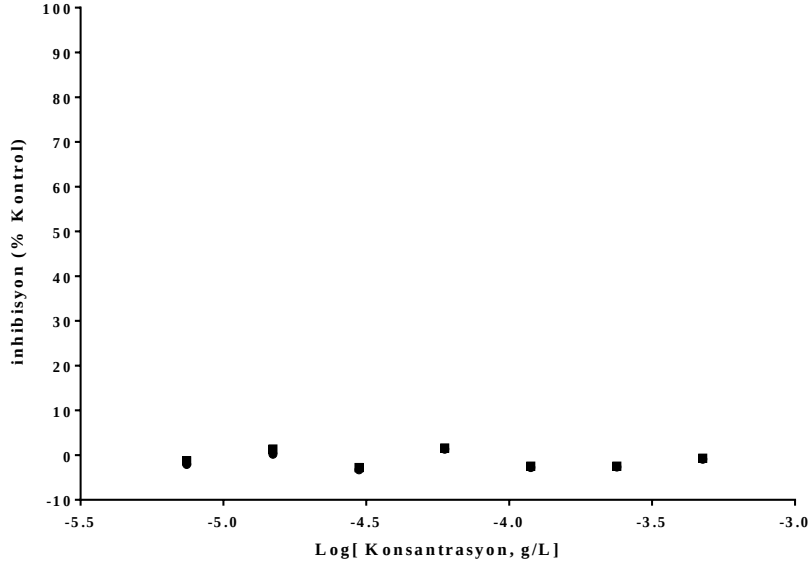
Şekil 4.25 *E. macroclada* Boiss. bitkisi çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.26'da değişen doz aralıklarındaki inhibitör etkileri incelendiğinde en yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen KAT enzimi inhibisyonu sırayla %60 ve %20'dir, dolayısıyla %40 inhibisyon farkı vardır ve bu da *E. macroclada* bitki yaprağı özütünün inhibitör etkinliğini göstermektedir. IC_{50} değeri ise, 0.119 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.



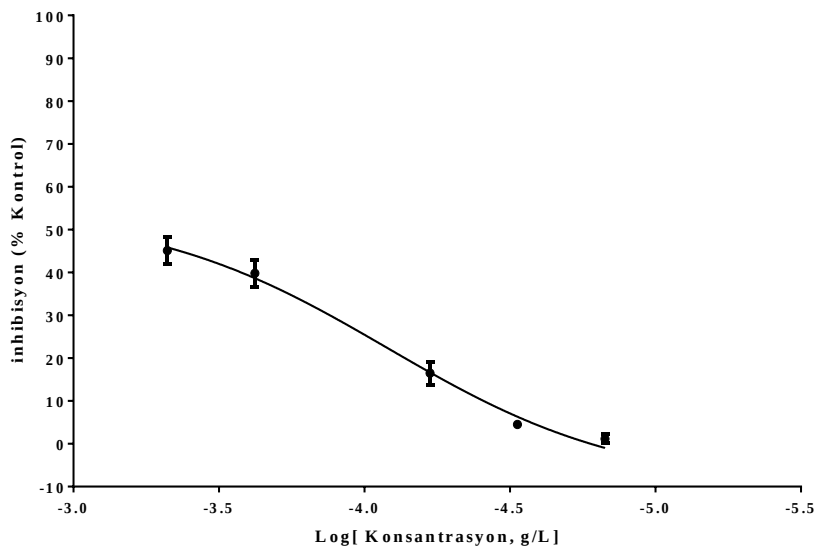
Şekil 4.26 *E. macroclada* Boiss. bitki yaprağı özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (IC_{50} değeri 0.119 $\mu\text{g/mL}$)

M. officinalis bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.27) incelendiğinde, kullanılan dozların hiç birisinde KAT enzimi inhibisyonu görülmemektedir.



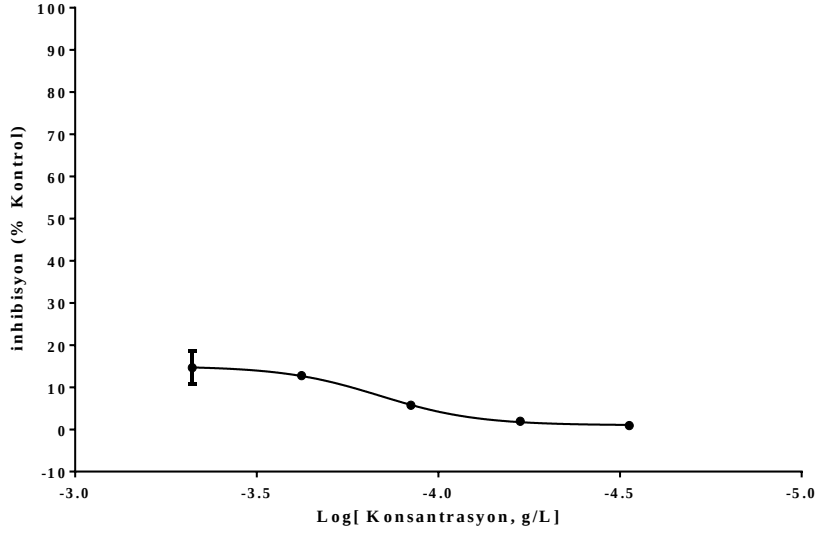
Şekil 4.27 *M. officinalis* (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

En yüksek dozda gözlenen %50 KAT enzim inhibisyonu ve IC_{50} değerinin (Şekil 4.28) gözlenmesi *Z. fabago* bitki meyve özütünün iyi bir KAT inhibitörü olduğunu göz önüne sermektedir. IC_{50} değeri ise, $0.083 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

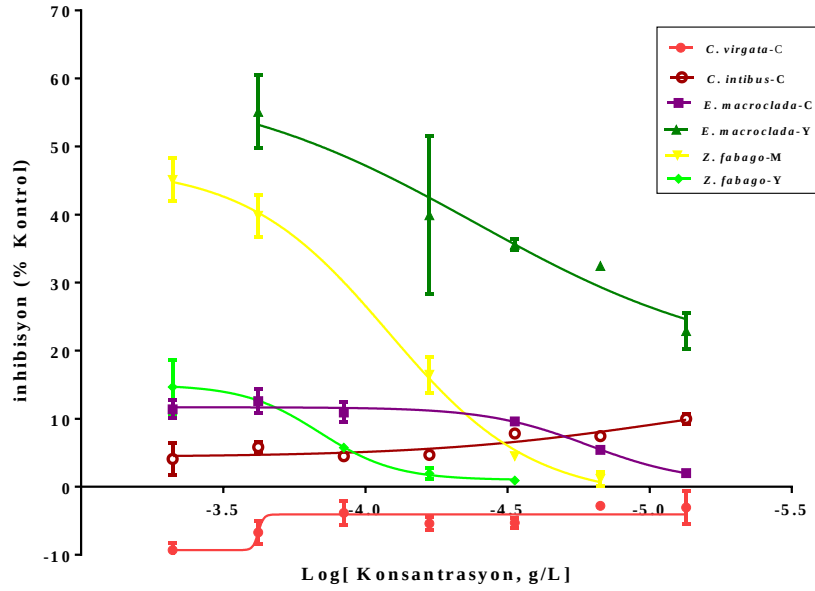


Şekil 4.28 *Z. fabago* L. bitki meyve özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi (IC_{50} değeri $0.083 \mu\text{g/mL}$)

Şekil 4.29'da *Z. fabago* bitki yaprağından elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında bile en fazla %12 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



Şekil 4.29 *Z. fabago* L. bitki yaprağı özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

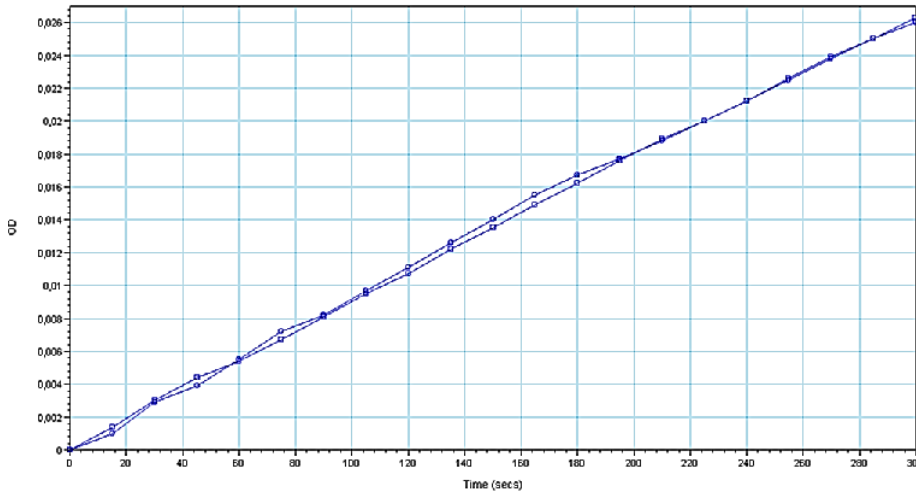


Şekil 4.30 Bitki özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.9 Bitki Özütlerinin Superoksit Dismütaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan SOD enzim aktivitesini belirtmek amacıyla, Geller ve Wing (1984) tarafından geliştirilmiş metod kullanılmıştır. Bu metotta, 0.3 mM ksantin, 25 mM NBT ve ksantin oksidaz içeren ksantin- ksantin oksidaz sisteminden oluşan süperoksit radikalleri SOD enzim sisteminde kullanılmadığı takdirde ortamda bulunan NBT bileşiğinin redüksiyonuna ve dolayısıyla ortamdaki renk değişimine neden olmuştur. Ortamdaki renk değişimi spektrofotometrik olarak 550 nm’de ortamda bulunan redüklenmiş NBT miktarına göre ölçülmüştür.

Bitki özütleri olmadan, yani sadece SOD enziminin oluşturduğu aktivite değeri 0.9282 mg/mL enzim için ölçülen 0.3818 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değere kıyaslanarak belirlenmiştir. SOD enzim aktivite eğrisi şekil 4.31’de sunulmuştur.

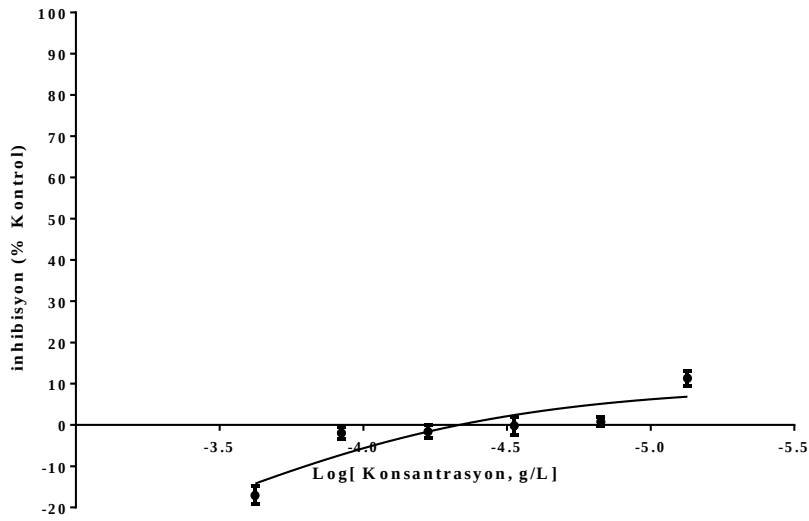


Şekil 4.31 SOD enzim aktivite eğrisi (Spektrometreden alınan aktivite eğrisi)

SOD enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra; *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis* bitki çiçeği, *E. macroclada* bitki yaprağı ve çiçeği ve *Z. fabago* bitki yaprağı ve meyve özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim

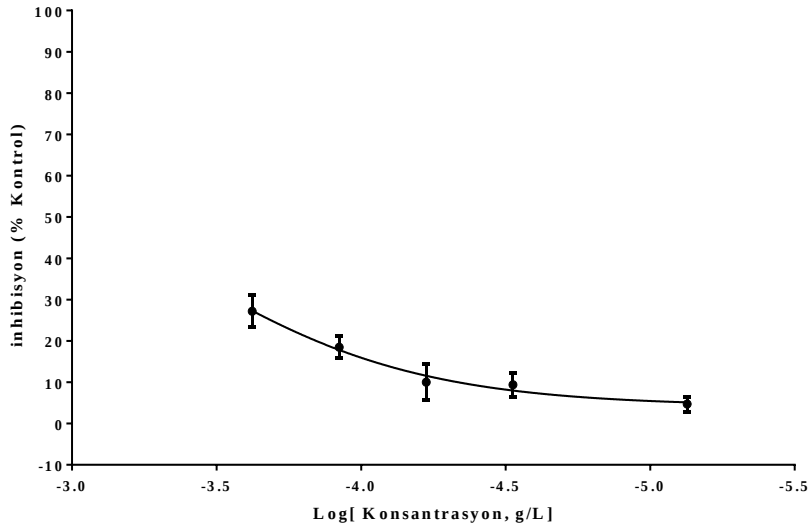
grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşı çizildiği doz-cevap grafikleri olarak şekil 4.32 - 4.39'da gösterilmiştir.

C. virgata bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.32) gözlenerek bu bitki özütünün sadece en düşük dozda en fazla %10 oranında SOD enzimi inhibisyonu yaptığını göstermektedir.



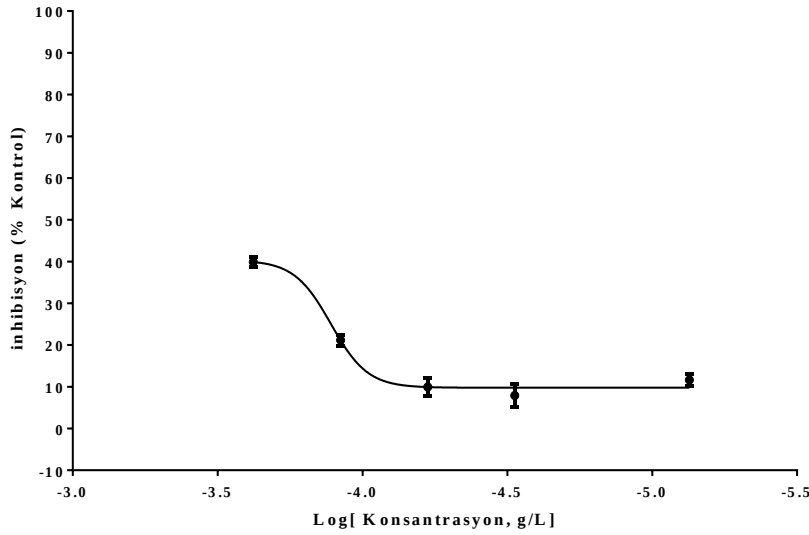
Şekil 4.32 *C. virgata* Lam. bitki çiçeği özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

C. intybus bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.33) gözlenerek en yüksek dozda bu bitki özütünün %30 oranında SOD enzimi inhibisyonu yapmasını belirtmektedir.



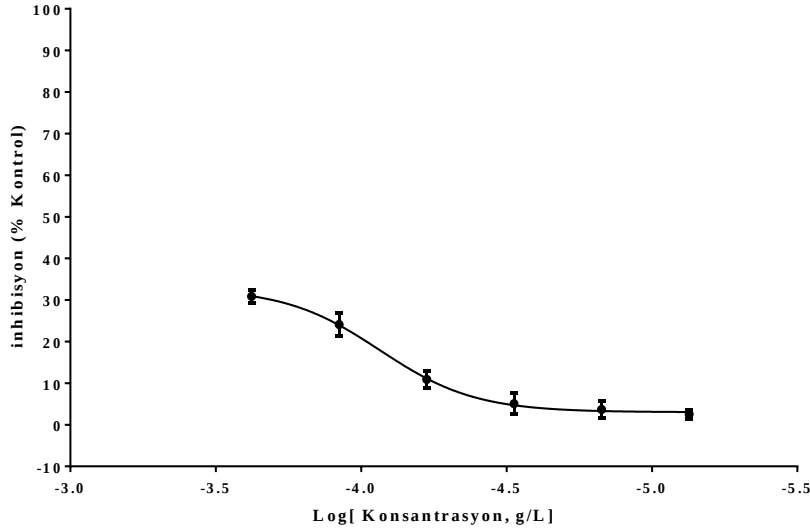
Şekil 4.33 *C. intybus* L. bitki çiçeği özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

E. macroclada bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.34) gözlenerek ve en yüksek ve düşük dozlarda sırayla %40 ve %10 SOD enzimi inhibisyonu yapması, bu da *E. macroclada* bitki çiçeği özütünün %30 SOD enzimi inhibisyonu yapmasını belirtmektedir.



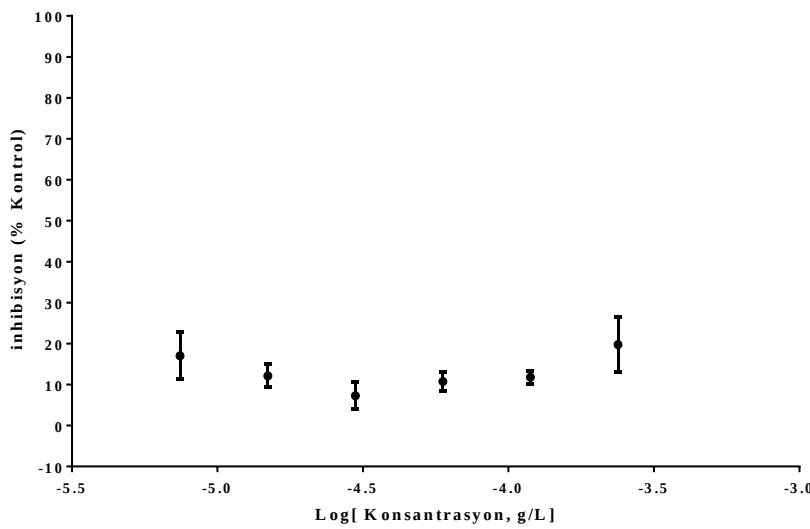
Şekil 4.34 *E. macroclada* Boiss. bitki çiçeği özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.35'te sunulan doz-cevap eğrisinde, en yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen sırayla %30 ve %5 SOD enzimi inhibisyonun görülmesi *E. macroclada* bitki yaprağı özütünün %25 inhibisyon yaptığını göstermektedir.



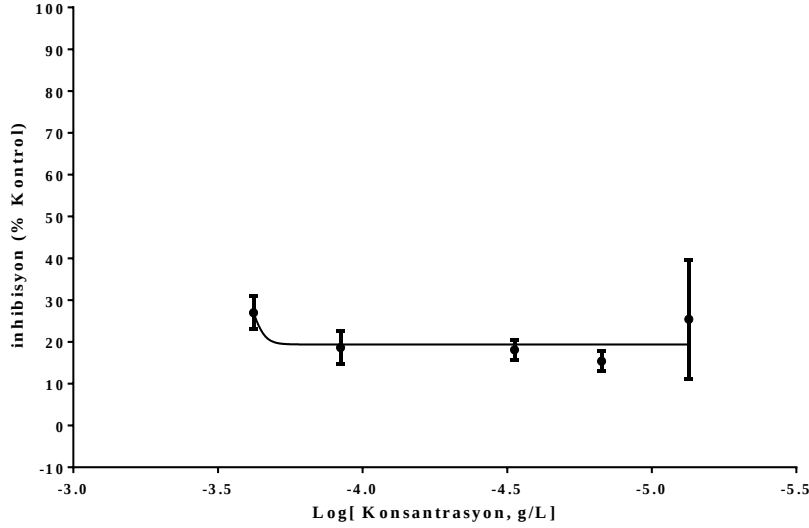
Şekil 4.35 *E. macroclada* Boiss. bitki yaprağı özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

M. officinalis bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.36) izlendiğinde, kullanılan dozların hiç birisinde SOD enzimi inhibisyonu görülmemektedir.



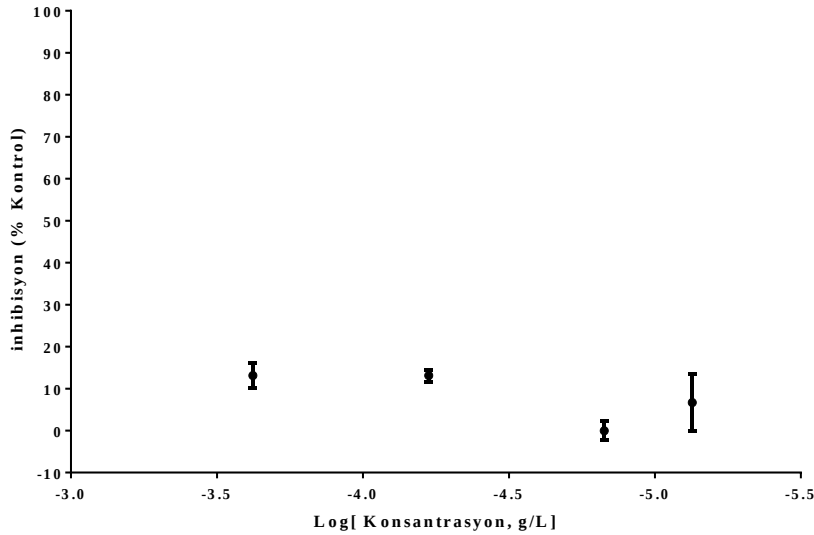
Şekil 4.36 *M. officinalis* (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Z. fabago bitki meyvesi özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.37) izlendiğinde, bütün dozlarda inhibisyon oranı %20 ve %25 arasında sabit kalmasını göstermektedir.

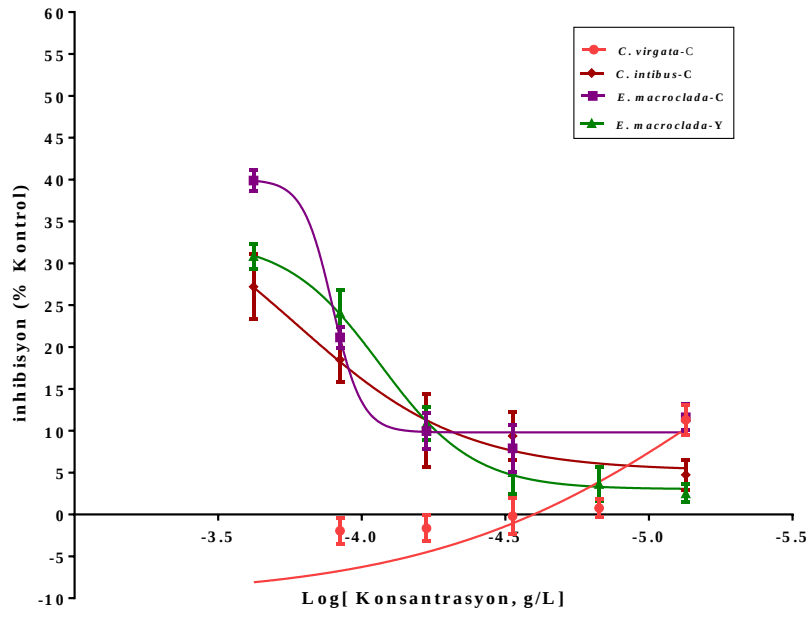


Şekil 4.37 *Z. fabago* L. bitki meyvesi özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.38’de *Z. fabago* bitki yaprağı özütünün doz-cevap eğrisi incelendiğinde, kullanılan dozların hiç birisinde SOD enzimi inhibisyonu görülmemektedir.



Şekil 4.38 *Z. fabago* L. bitki yaprağı özütünün superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

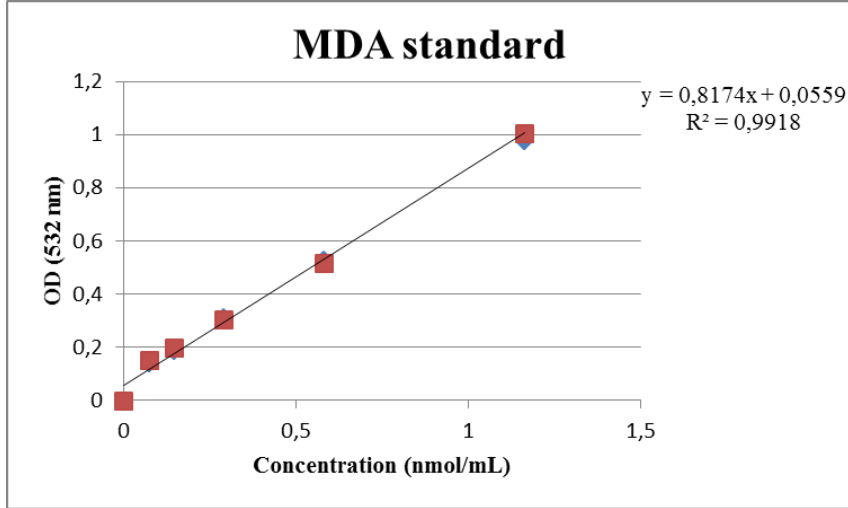


Şekil 4.39 Bitki özütlerinin superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.10 Bitki Özütlerinin Lipit Peroksidasyon Üzerinde Olan Etkileri

Bitki özütlerinin lipit peroksidasyon üzerinde olan etkilerini belirlemek amacıyla tiyobarbiturik asit (TBARS) metodu kullanılmıştır. Bu metotta, lipit peroksidasyonunun son ürünü bilinen MDA, asidik ve sıcak bir ortamda TBA ile reaksiyona girerek, MDA-TBA kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleksten ortaya çıkan pembe renk spektrofotometrik olarak 532nm’de MDA miktarındaki düşüşe bağlı olarak absorpsiyondaki görülen azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir.

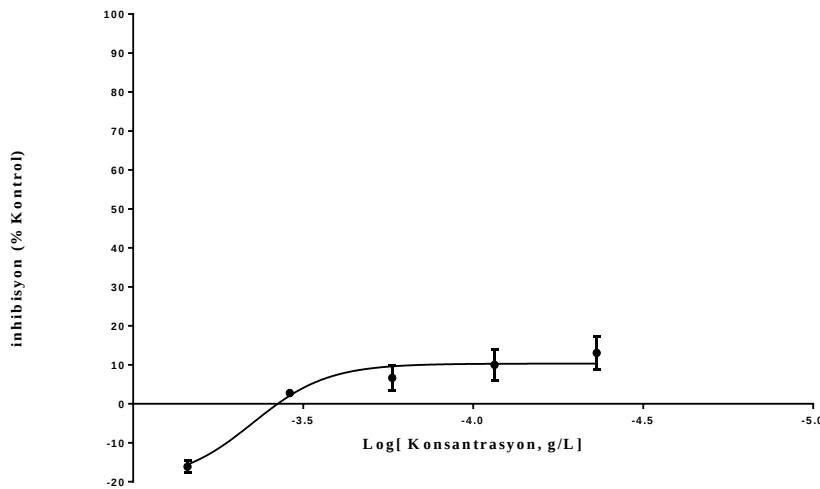
Bitki özütleri olmadan sadece karaciğer dokusundan elde edilen sitozolun (11.602 mg/mL), Malondialdehit (MDA) miktarı 0.151 (nmol/mgprotein) olarak hesaplanmıştır. Bu değer karaciğerden elde edilen sitozolun toplam MDA miktarı olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin lipit peroksidasyonu üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak belirlenmiştir. Karaciğer dokusundan elde edilen sitozolun toplam MDA miktarı, MDA kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için MDA’dan hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardan oluşan solüsyonlardan elde edilen absorbans değerlerine göre çizilmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 MDA kalibrasyon eğrisi

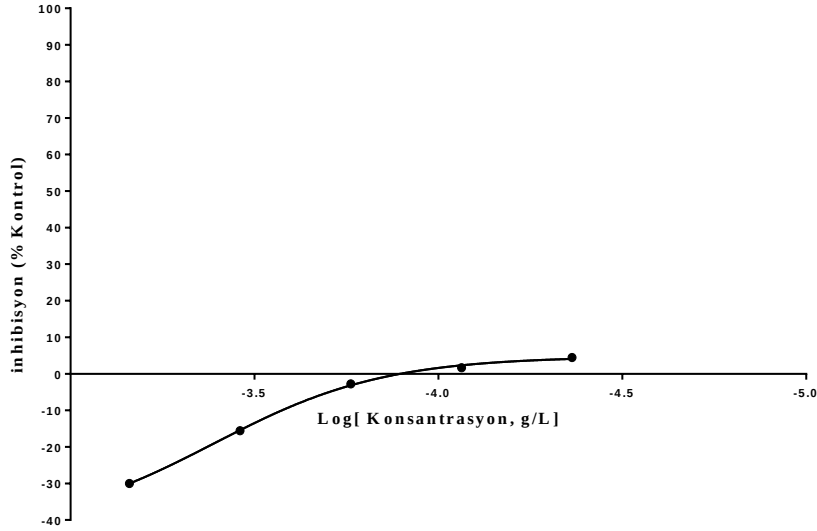
Sitozol toplam MDA miktarı hesapladıktan sonra; *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis* bitkilerinin çiçekleri, *E. macroclada* bitkisinin yaprağı ve çiçeğı ve *Z. fabago* bitkisinin yaprağı ve meyve özütlerinin lipid peroksidasyon üzerine olan etkileri çalışılmıştır. Sitozol toplam MDA miktarına dayanılarak lipid peroksidasyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevap grafikleri Şekil 4.41- 4.48’de gösterilmiştir.

Şekil 4.41’de *C. virgata* bitki çiçeğinden elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında en fazla %10 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



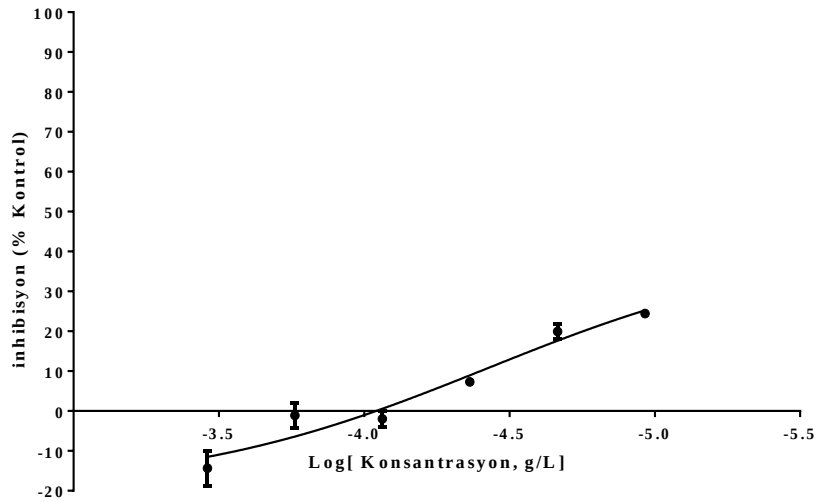
Şekil 4.41 *C. virgata* Lam. bitki çiçeğı özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi

Şekil 4.42’de *C.intybus* bitki çiçeğinden elde edilen özütün en düşük dozu kullanıldığında en fazla %5 oranında inhibisyon yaptığı görülmektedir.

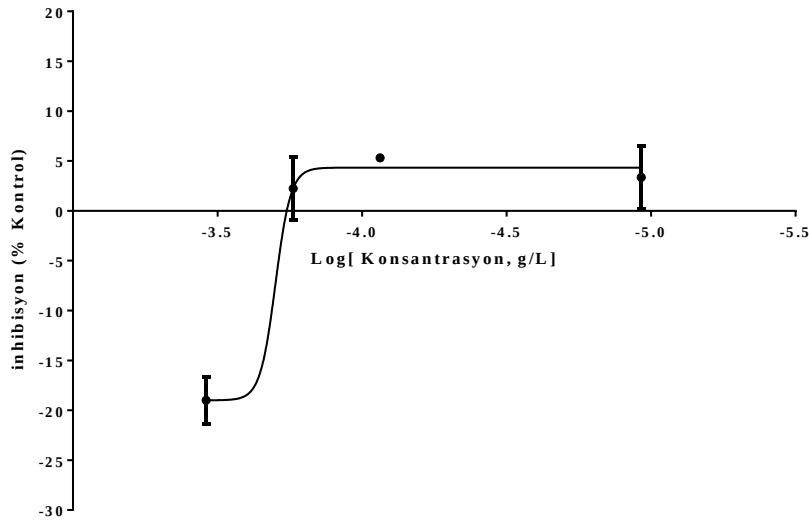


Şekil 4.42 *C. intybus* L. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi

Şekil 4.43 ve 4.44’te *E. macroclada* bitki çiçeği ve yaprağından elde edilen özütlerin en düşük dozu kullanıldığında sırasıyla en fazla %30 ve %5 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



Şekil 4.43 *E. macroclada* Boiss. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi



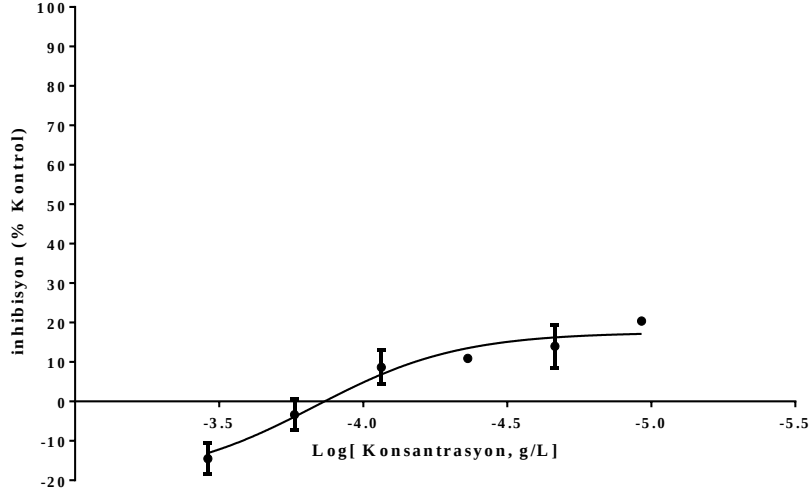
Şekil 4.44 *E. macroclada* Boiss. bitki yaprağı özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi

M. officinalis bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.45) gözlenerek bu bitki özütünün en yüksek doz hariç, diğer dozlarda en fazla %5 oranında lipid peroksidasyon inhibisyonu yaptığını göstermektedir.

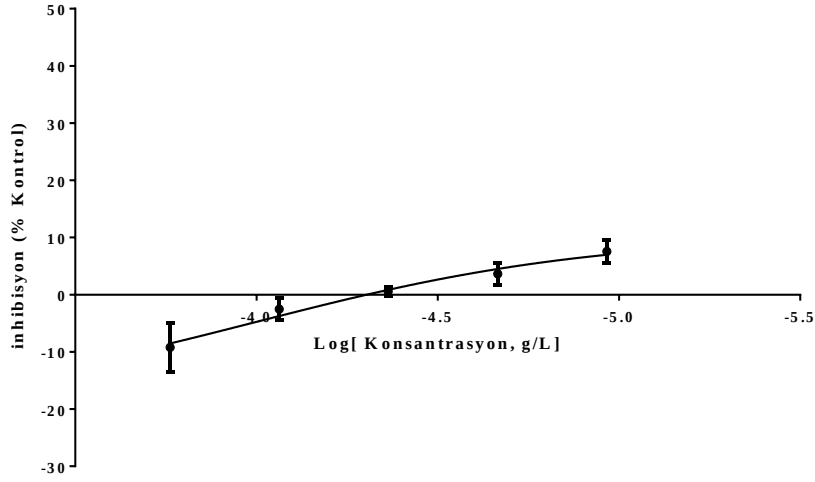


Şekil 4.45 *M. officinalis* (L.) Pall. bitki çiçeği özütünün lipid peroksidasyon üzerine olan etkisi

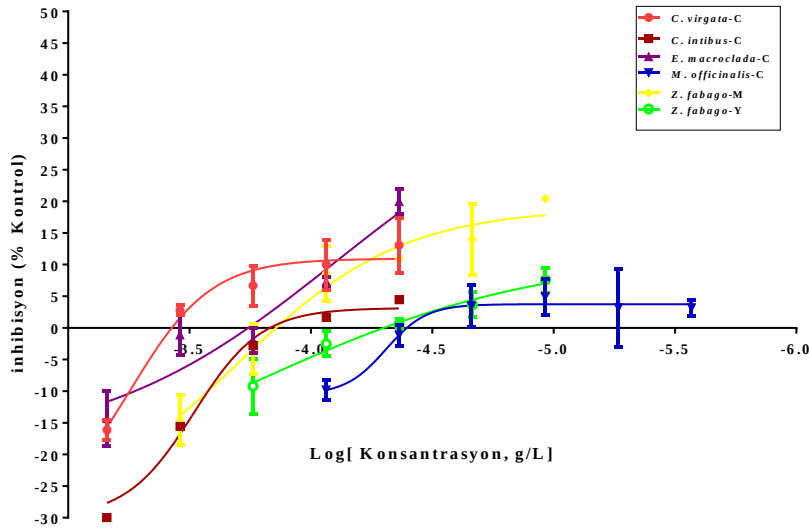
Şekil 4.46 ve 4.47’de *Z. fabago* bitki meyvesi ve yaprağından elde edilen özütlerin en düşük dozu kullanıldığında sırasıyla en fazla %25 ve %10 inhibisyon yaptığı görülmektedir.



Şekil 4.46 *Z. fabago* L. bitki meyvesi özütünün lipit peroksidasyon üzerine olan etkisi



Şekil 4.47 *Z. fabago* L. bitki yaprağı özütünün lipit peroksidasyon üzerine olan etkisi

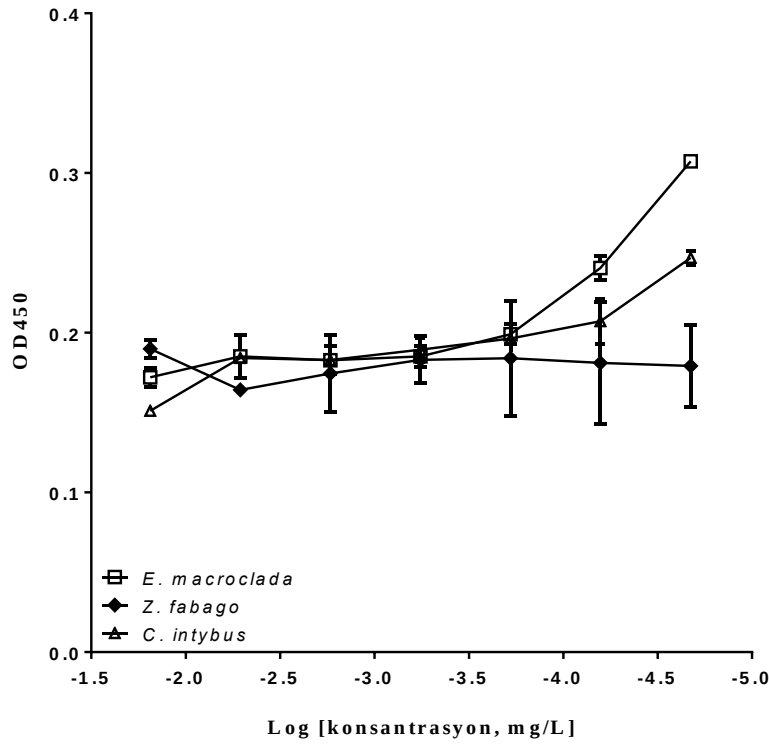


Şekil 4.48 Bitki özütlerinin lipit peroksidasyon üzerine olan etkisi

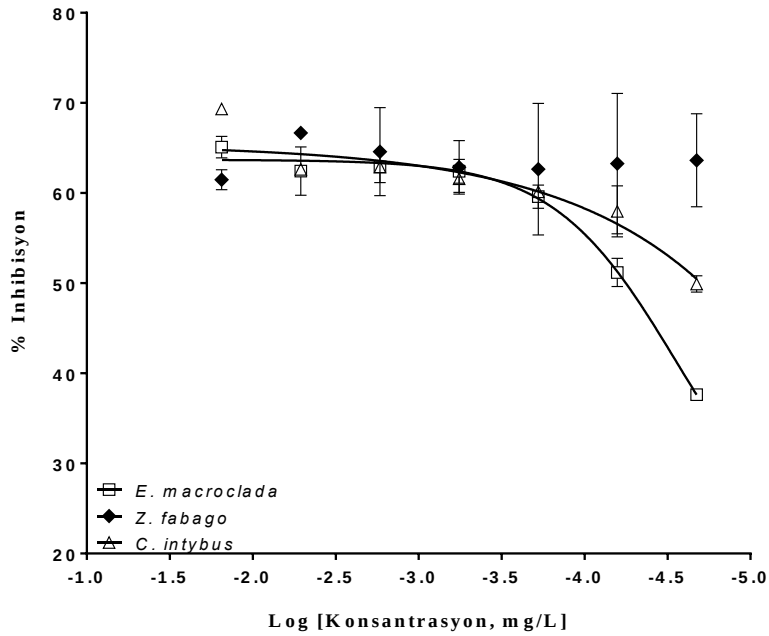
4.11 XTT Metodu ile Özütlerin Kanser Hücresi Üzerine Olan Sitotoksik Etkileri

Çalışma kapsamında daha önce enzim çalışmalarında en iyi enzim inhibisyonu gösteren *Z. fabago* 'nun meyvesi, *E. macroclada*'nın yaprağı ve *C. intybus*'un çiçeğinden hazırlanan metanol özütlerinin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacı ile HL-60 ve MCF-7 kanser hücre hatlarına 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0.372-23.81 µg/mL) uygulama yapılmıştır. Uygulama yapılmamış kontrol hücreler ve bitki özütleri ile muamele edilmiş örnekler 4 saat boyunca 37°C 'de XTT reaktifi ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı mitokondrisi aktif olan uygulama yapılmamış hücrelerdeki formazan oluşumuna bağlı olarak turuncu rengin oluşumu 450 nm dalga boyunda yapılan kolorimetrik analizine göre % 100 canlı olarak kabul edilmiştir. Uygulama yapılan hücrelerdeki spektrofotometre okuması bu değer ile oranlanarak hücre canlılığı olarak (%) ifade edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, *E. macroclada* yaprağının ve *C. intybus* çiçeğinin metanol özütlerinin farklı dozlarda %65 ve %69 civarında HL-60 hücre canlılığının inhibe ettiğini göstermiştir (Şekil 4.49 ve Şekil 4.50). IC50 değerleri ise, 0.027 ve 0.002 µg/mL olarak belirlenmiştir. *Z. fabago* meyvesinden hazırlanan özüt tüm dozlarda inhibisyon oranı %61 civarında sabit kalmıştır. Hazırlanan bitki özütlerinin hiç birisi MCF-7 meme kanseri hücre canlılığına her hangi bir etki göstermemiştir.



Şekil 4.49 XTT metodunda gerçekleştirilen absorbans değişimi



Şekil 4.50 Bitki özütlerinin HL-60 hücre hattı üzerinde olan etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışma kapsamında, iklim özelliklerinden dolayı zengin bitki florasına sahip Ankara'nın çeşitli bölgelerinde yetişen *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis*'in çiçek kısımları, *E. macroclada*'nın çiçek ve yaprak kısımları ve *Z. fabago*'nun meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen metanollü özütlerin mikrobiyolojik ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada, bitkilerin ilgili kısımlarından elde edilen metanollü özütlerin toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarı, protein içerikleri ve insanda şarta bağlı patojenik etkisi olan beş farklı bakteri ve maya suşları üzerinde antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Ayrıca, bitki özütlerinin kemoterapötik direnç mekanizmalarına olan etkileri aynı zamanda antioksidan savunmada görev yapan SOD ve GST enzimlerine olan etkileri doz-cevap analizleriyle ve kemoterapötiklerin etkinliği üzerinde rolü olan antioksidan savunma sistemi enzimlerine (KAT ve GPx) ve lipid peroksidasyon mekanizmasına olan etkinlikleri doz-cevap analizleriyle incelenmiştir. En son aşamada ise, bitki özütlerinin hücre canlılığı ve büyümesi üzerine etkileri, insan lösemi (HL-60) ve meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde sitotoksiste analizleriyle araştırılmıştır.

Kemoterapötik uygulamaların önemli bir yan etkisi olarak görülen bağışıklık sisteminin zayıflaması ile bağışıklık sisteminde üretilen ROT'un üretiminde azalma, hastanın enfeksiyona açık hale gelmesi gibi sebeplerle terapinin etkinliğini yitirmesine veya uzun süreye yayılarak sürmesine neden olduğu bilinmektedir. Bazı bitki özütlerinde bulunan uçucu yağlar, alkaloidler, fenoller ve flavonoidlerin antimikrobiyal etkilerinin olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir (Cowan 1999) .

Bu çalışmada; *C. virgata*, *C. intybus* ve *M. officinalis*'in çiçeği, *E. macroclada*'nın çiçeği ve yaprağı ve *Z. fabago* meyvesi ve yaprağından elde edilen metanollü özütlerinin Gram (+) (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) ve Gram (-) (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) bazı bakteriler ve maya suşu (*Candida albicans*) üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen bitki kısımlarından elde edilen metanollü özütler 5 µL ve 20 µL olmak üzere 6 mm'lik disklerle emdirilmiştir. Yalnız, 5 µL özüt emdirilen hiç bir

bitki örneğinin diskleri çevresinde önemli ölçüde zon gözlemlenememiştir. Sonuçlara göre her bir bitki özütü en az bir mikroorganizma suşu üzerinde inhibisyon etki göstermiştir.

S. aureus gıda zehirlenmesi, osteomiyelit, poliartrit ve endokardit gibi birçok hastalığın nedeni olarak tanınmaktadır (Hajjeh vd. 1999). Bu çalışmada, *E. macroclada* bitkisi yaprağı haricinde tüm metanollü bitki özütleri *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki sergilemiştir. Ayrıca, *C. virgata* çiçeğinden elde edilen özüt; *S. aureus* üzerinde 16 mm, *B. subtilis* ve *E. coli* üzerinde 18 mm ve *P. aeruginosa* üzerinde 15 mm zon çapı oluşturarak bu bakteri suşlarına karşı en etkili özüt olmuştur. *C. virgata* bitkisi çiçeğinin metanol özütünün *S. aureus* ve *B. subtilis*'e olan etkisinin pozitif kontrol olan tetrasiklin'e göre daha etkin olduğu ve gentamisin ile aynı etkiyi gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu bitki özütünün *E. coli* üzerinde, pozitif kontrol olan ampisiline yakın bir etki gösterdiği, *P. aeruginosa*'ya olan etkisinin de gentamisin ve stromptomisin kontrolleri ile aynı olduğu görülmüştür.

En düşük antimikrobiyal aktivite *M. officinalis*'in çiçeğinden hazırlanan özütte gözlemlenmiştir. *M. officinalis*in çiçeğinden elde edilen özüt sadece *S. aureus* üzerinde 10 mm'lik zon oluşturarak, antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca, antimikrobiyal deneylerinde tek maya suşu olarak kullanılan *C. albicans* tüm bitki özütlerine karşı direnç göstermiştir.

Toplam protein tayini çalışmasında, *E. macroclada* bitkisi yaprağı (48.99 mg/mL) çalışılan diğer bitkilerin kısımlarının metanollü özütlerine göre oldukça fazla miktarda protein içerik göstermiştir. Bu bakımdan *E. macroclada* bitkisi yaprağı oldukça dikkat çekicidir. Ayrıca, *M. officinalis* bitkisi çiçeği içerdiği 7.33 mg/mL protein miktarı ile en düşük protein içerikli özüt olarak belirlenmiştir.

Fenolik bileşikler, antioksidan aktivite de dahil olmak üzere birden fazla biyolojik etki göstermektedir. Bu nedenle, bitki özütlerinin fenolik içeriklerinin değerlendirilmesi oldukça önem kazanmıştır. Çalışma kapsamında, bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi Folin-Ciocalteu (FCR) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Toplam fenolik madde tayini çalışmasında *E. macroclada* bitkisi yaprağı metanol özütünün, çalışılan diğer bitkilerin kısımları ve metanol özütlerine göre daha fazla (573.10 mg/mL) fenolik bileşik içerdiği gözlenmiştir. Elde edilen veriler, *M. officinalis* bitkisi çiçeğinin içerdiği 44.01 mg/mL fenolik madde miktarı ile en düşük fenolik madde miktarına sahip olduğunu göstermiştir.

Çalışılan bitkilerde bir fenolik bileşik olan flavonoidin, tayini çalışması sonucunda *E. macroclada* bitkisi yaprağının metanol özütünün (450.70 µg/mL), diğer bitki özütlerine göre daha fazla flavonoid içerdiği saptanmıştır. Ayrıca, *Z. fabago* bitkisi meyvesi içerdiği 28.96 µg/mL flavonoid bileşiği ile en düşük flavonoid içerikli özüt olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; toplam protein miktar tayini, fenolik ve flavonoid bileşik tayini çalışmalarında *E. macroclada* bitkisi yaprağının metanollü özütü diğer bitki özütlerine göre önemli derecede bu bileşikleri içerdiği görülmüştür.

Bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen metanollü özütlerin glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GP_x), katalaz (KAT), süperoksid dismutaz (SOD), lipid peroksidasyon ve HL-60 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde olan etkilerini inceleme amacıyla, bitki özütlerinin konsantrasyonları bitkilerin toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş olup, konsantrasyon - % inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur. İnhibisyon gösteren bitki örnekleri özütlerinin % inhibisyon yapan konsantrasyonları (IC₅₀), bu standardize değerler üzerinden µg/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam fenolik bileşik miktarına göre konsantrasyonları en düşük (0.186 µg/mL) ve en yüksek (23.81 µg/mL) olarak standardize edilmiş, bitki özütleri 1/2 oranında 8 doza dilüye edilmiştir.

Normal fizyolojik şartlarda oluşan hücre içi reaktif oksijen bileşiklerinin detoksifikasyonu antioksidan savunma sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu sistem ise KAT, SOD ve GP_x enzimlerini kapsamakla beraber, glutatyon metabolizmasında rol alan GST enziminin de antioksidan savunma ve ROT detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynadığı belirlenmiştir. Hücresel ROT düzeyindeki artışın hücre döngüsünü yavaşlatması sebebiyle kanser

kemoterapötiklerinin etkinliklerini düşürdüğü, kaspaz aktivitesinin inhibisyonunu yaparak ve ölüm reseptörlerini inaktifleştirerek terapötik aracılıklı apoptozu engellediği ve bunun sonucunda bazı kemoterapötiklerin etkinliğini düşürdüğü gösterilmektedir (Conklin 2004). Bu sebeple fenolik bileşikler gibi lipid peroksidasyonunu engelleyecek antioksidanların kullanımının kanser terapötik etkinliğini arttıracakı düşünülmektedir. Diğer taraftan ROT detoksifikasyonu sırasında açığa çıkan hidrojen peroksidin katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimlerinin inhibisyonuna bağlı olarak veya nonsteroid antienflamatuvar ilaçların varlığında birikmesi sonucu kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla seçici apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir (Marchetti vd. 2009). Dolayısıyla kemoterapötik etki mekanizmasına bağlı olarak farklı yollarla ROT detoksifikasyon mekanizmasının kontrolünün ilaç etkinliğini arttıracakı düşünülmektedir. Bu çalışmada, farklı bitki kısımlarından elde edilen metanollü özütlerin, oksidatif savunma sisteminde rol alan enzimler üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında, ilk olarak metanollü bitki özütlerinin, GST enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Özütlerin GST enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Habig ve arkadaşları (1974) tarafından geliştirilmiş metot, modifiye edilmiş ve mikroplaka uygulamaları için minyatürize edilmiştir. Bu amaç kapsamında, toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş konsantrasyonlar 7 dozda (0.372-23.80 $\mu\text{g/mL}$ $\mu\text{g/mL}$) kullanılmıştır. Mikroplaka düzeyinde uygulamak amacıyla ilk olarak, bitki özütleri olmadan sığır karaciğerinden kısmen izole edilen GST enzimi, içerdiği protein miktarına göre 4.069, 5.94, 1.252 ve 0.782 mg/mL olmak üzere enzim kalibrasyonu yapılmıştır. Her konsantrasyon için ayrı ayrı grafik eğrileri çizilmiştir. Çizilen grafik sonuçlarına göre en iyi enzim aktivitesi grafik eğrisi 0.782 mg protein/mL (Şekil 4.4) konsantrasyonuna ait olduğu için tüm GST deneyi boyunca kullanılan sitozol miktarı 0.782 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, bu değer için ölçülen enzim aktivitesi 1.721 $\mu\text{mol/min/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GST enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değer ile kıyaslanarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, *Z. fabago* meyvesinden elde edilen özüt 0.447 µg/mL IC₅₀ değeri ile %50 oranında GST enzimini inhibe etmiştir. Ayrıca, *C. intybus* çiçeğinden elde edilen özüt 0.334 µg/mL IC₅₀ değeri ile %49 oranında GST enzimini inhibe ederek iyi bir GST enzimi inhibitörü olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, en zayıf inhibisyon oranı *E. macroclada* yaprağından elde edilen özütte tespit edilmiştir.

Bitki özütlerinin glutatyon peroksidaz (GP_x) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla İşgör ve arkadaşları (2008) tarafından sunulan metot kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak enzim kalibrasyonu yapmak için sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan GP_x enzimi, içerdiği protein miktarına göre 5 dozda (0.464, 0.928, 1.856, 3.713 ve 7.426 mg/mL) kullanılmıştır. Her protein konsantrasyonu için ayrı ayrı grafikler çizilmiştir. Çizilen grafik sonuçlarında, en iyi grafik eğrisi 0.928 mg/mL için tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Bu değer için ölçülen enzim aktivitesi 0.045 mmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GP_x enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değer ile kıyaslanarak belirlenmiştir.

Bitki özütlerin GP_x enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla deneyde toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş konsantrasyonlardan 6 doz (0.744 - 23.81µg/mL) kullanılmıştır. GP_x deneyinde, GP_x enzim aktivite tayini, glutatyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla, bu metodu uygulamak amacıyla, GP_x enziminin substratları olarak tanınan hidrojen peroksit, kumil hidroperoksit ve tert-butil hidroperoksit maddelerinin GP_x enzim aktivitesi üzerinde olan etkileri araştırılmıştır. Kullanılan her substrat için ayrı ayrı GP_x enzim aktivite hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, GP_x için en iyi substratın kumil hidroperoksit olduğunu göstermiştir.

Elde edilen doz-cevap eğrileri incelendiğinde, *E. macroclada* ve *C. intybus* çiçeğinden izole edilen özütlerin %30 oranında GP_x enzimini inhibe ettikleri gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *M. officinalis* çiçeğinden elde edilen özüt %16 inhibisyon oranıyla en düşük GP_x inhibisyonunu göstermiştir.

Bitki özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla Aebi (1984) tarafından geliştirilmiş metot modifiye edilmiş ve miktoplaka uygulamaları için minyatürize edilmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi, katalaz enzimi H_2O_2 molekülünü su ve oksijen moleküllerine çevirmektedir. Dolayısıyla, katalaz enzimi çalışmasında ilk aşamada substrat olarak kullanılan H_2O_2 molekülünün kalibrasyonu yapılmıştır. Daha sonra, ticari olarak temin edilen katalaz, saf enzim kullanılarak kromojen olarak kullanılan 4.AP ve DHBS konsantrasyonları ile kalibre edilmiştir. Ayrıca, deneyde kullanılan tüm reaktifler kalibrasyon sonrası sıgır karaciğerden elde edilen sitozol üzerinde incelenmiştir. Ancak elde edilen sonuçlara göre sıgır karaciğerden izole edilen sitozolün katalaz enzimini içermediği görülmüştür. Dolayısıyla, tüm deneyler ticari olarak temin edilen saf katalaz enzimi kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca, bitki özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, toplam fenolik madde miktarına göre 7 doz (0.372-23.81 $\mu\text{g/mL}$) olarak standardize edilmiş konsantrasyonlardan kullanılmıştır.

Bitki özütlerinin katalaz enzimi üzerinde olan etkilerinden elde edilen doz-cevap eğrileri incelendiğinde, *Z. fabago* meyvesinden elde edilen özüt 0.083 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile %50 oranında katalaz enzimi inhibe etmiştir. Ayrıca, *E. macroclada* yaprağından elde edilen metanollü özüt %40 oranında 0.119 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile katalaz enziminin inhibisyonuna neden olmuştur. Bu deneyde, *C. virgata* ve *M. officinalis* çiçeğinden elde edilen metanollü özütlerin doz-cevap eğrileri incelendiğinde, bu bitki özütlerinin hiçbirinin katalaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür.

Bitki özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Geller ve Wing (1984) tarafından geliştirilmiş metot, kısmen değiştirilmiş ve miktoplaka uygulamaları için minyatürize edilmiştir. Bu amaçla, ilk olarak bitki özütleri olmadan sıgır karaciğer dokusundan izole edilen SOD enzimi, içerdiği protein miktarına göre 1.856 mg/mL, 1.392 mg/mL, 0.928 mg/mL ve 0.464 mg/mL konsantrasyonlarında kalibre edilmiştir. Her konsantrasyon için ayrı ayrı grafik eğrileri çizilmiştir. Elde edilen grafik sonuçlarına göre en iyi enzim aktivite grafik eğrisi 0.928 mg/mL (Şekil 4.31) protein miktarı sahip konsantrasyona ait olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, tüm SOD enzim aktivite tayininde kullanılan sitozol miktarı 0.928 mg/mL

olarak kullanılmıştır. Ayrıca, bitki özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla, toplam polifenol madde miktarına göre 6 doz (0.372-11.90 µg/mL) olmak üzere standardize edilen konsantrasyonlardan kullanılmıştır. SOD enzim aktivite tayini deneyinde önemli olan faktör pH faktörüdür. Bu deney genelde bazik ortamda sonuç göstermektedir. Dolayısıyla, bu deneyin hassasiyetini korumak amacıyla pH kalibrasyonu yapılmıştır.

Bitki özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerinde yaptıkları etkileri ve elde edilen doz-cevap eğrileri gözlemlendiğinde *C. intybus* ve *E. macroclada* çiçek özütleri %30 oranında SOD enzimini inhibe ederek diğer özütlere göre daha iyi inhibisyon oranı göstermiştir. Ayrıca elde edilen veriler, *C. virgata* ve *M. Officinalis*'in çiçeğinden ve *Z. fabago*'nun yaprağından hazırlanan metanollü özütlerin SOD enzimi üzerinde en zayıf etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu üzerinde olan etkilerini belirlemek amacıyla Okhawa ve arkadaşları (1979) tarafından geliştirilen TBARS metodu, kısmen modifiye edilerek kullanılmıştır. TBARS metodunun temeline göre lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinen malondialdehit (MDA) asidik ve sıcak ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmektedir. Dolayısıyla, bu reaksiyonun gerçekleştirilmesi için farklı konsantrasyonlarda triklörasetik asit (TCA) reaktifi kullanılarak ortamın pH'sı kalibre edilmiştir.

Karaciğer dokusundan elde edilen sitozolün toplam MDA miktarı, MDA kalibrasyon eğrisine göre hesaplandığı için, MDA'dan hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardan oluşan solüsyonların absorban değerleri ölçülmüş ve grafik eğrileri çizilmiştir. Daha sonra, kalibrasyon amaçlı sığır karaciğerden elde edilen sitozol içerdiği protein miktarına göre farklı konsantrasyonlarda (2.32, 4.64, 9.28, 11.603 ve 23.207 mg/mL) kullanılmıştır. Farklı protein konsantrasyonlardan elde edilen absorbanlar MDA kalibrasyon eğrisi ile kıyaslanmıştır. Bu kıyaslamada en iyi sonuç 11.603 mg/mL protein miktarına sahip konsantrasyonda görülmüştür. Bitki özütlerinin lipid peroksidasyonuna olan etkilerini incelemek amacıyla toplam polifenol madde miktarına göre 5 doz (1.48-23.80 µg/mL) hazırlanan standart konsantrasyonlardan alınmıştır.

Ayrıca, farklı bir TBARS deneyinde bitki özütlerinin lipid peroksidasyonunu olumsuz etkilemediğinden emin olmak amacıyla TBARS deneyi sadece deneyde kullanılan bitki doz özütleri üzerinde (hiç sitozol olmadan) yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar deneyde bitki özütlerinin hiç bir negatif etki yapmadığı göstermiştir.

Bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu üzerinde yaptıkları etkileri ve elde edilen doz-cevap eğrileri incelendiğinde, *E. macroclada* çiçeğinden elde edilen özütün %30 oranında lipid peroksidasyonun inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür. Ayrıca, *Z. fabago* meyvesinden elde edilen doz-cevap eğrisi, bu bitkinin en yüksek dozu kullandığında %25 oranında lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Çalışma kapsamında, *C. intybus* ve *M. officinalis* bitki çiçeği ve *E. macroclada* bitki yaprağından elde edilen özütler %5 inhibisyon oranıyla en düşük inhibisyon sonucunu göstermiştir. TBARS deneyinde, doz-cevap eğrileri incelendiğinde inhibisyon oranları genel olarak en düşük dozlarda tespit edilmiştir. Bu nedenle, toplam fenolik bileşik miktarına göre konsantrasyonları en yüksek (1.48 µg/mL) ve en düşük (0.0462 µg/mL) olarak standardize edilmiş, bitki özütleri 1:2 oranında 6 doza dilüye edilmiştir. Ancak elde edilen veriler, bu dozlarda bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığını saptanmıştır.

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) ve 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil) tetrazolyum (XTT) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (sarı) kullanarak formazan boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak mikropilaka okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalı olmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada, bitki özütlerinin kanser hücre hatları üzerinde olan sitotoksikite etkisini incelemek için MTT ve XTT reaktifleri kullanılmıştır. İlk başta optimizasyon aşamasında hücre canlılığı ve hücrelerini metabolik aktivitelerini ölçmek amacı için MTT deneyi uygulandı yalnız MTT kültür ortamda formazan boyasına indirgendiğinde çözünülmez hale geldiği için mikropilaka okumalarında bir takım hatalara neden olarak, dolayısıyla XTT reaktifi tercih edilmiştir. XTT kullanımı tercih edildiğinin sebebi, XTT'nin hücreler tarafından yavaş indirgendiği ve kültür

ortamında çözünebileceği dir. Çalışma kapsamında daha önce enzim çalışmalarında en iyi enzim inhibisyonu gösteren *Z. fabago* ‘nun meyvesi, *E. macroclada*’nın yaprağı ve *C. intybus*’un çiçeğinden hazırlanan metanol özütlerinin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacı ile HL-60 ve MCF-7 kanser hücre hatlarına 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0.372-23.81 µg/mL) uygulama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *E. macroclada* yaprağının ve *C. intybus* çiçeğinin metanol özütlerinin farklı dozlarda %65 ve %69 civarında HL-60 hücre canlılığının inhibe ettiğini göstermiştir (Şekil 49 ve Şekil 50). IC50 değerleri ise, 0.027 ve 0.002 µg/mL olarak belirlenmiştir. *Z. fabago* meyvesinden hazırlanan özüt tüm dozlarda inhibisyon oranı %61 civarında sabit kalmıştır. Hazırlanan bitki özütlerinin hiç birisi MCF-7 meme kanseri hücre canlılığına her hangi bir etki göstermemiştir.

C. virgata bitkisi hakkında literatür taramalarında antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkinlikleri bakımından herhangi bir çalışmaya rastlanılmadığı için *Centaurea* cinsine ait olan başka bitki türleri üzerinde yapılan çalışmalar hakkında tartışma yapılmıştır.

Akbar vd. 1992 yılında, yaptıkları çalışmada *C. solstitialis*’in kurumuş olan toprak üstü kısımlarından elde edilen metanollü özütlerden izole ettikleri retin, solstitialin A, janerin ve sinaropikrinin normal sıçanlar üzerinde belirgin hipotermik etkisi olduğu tespit etmişlerdir.

Nergrette vd. (1993), *C. chilensis* üzerinde yaptıkları bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından izole ettikleri seskiterpen lakton bileşiğinin antimikrobiyal etkisini agar difüzyon yöntemi ile incelemişlerdir. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* suşlarının kullandığı deneyde alınan sonuçlar, bu bileşiklerin Gram (+) bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir.

Uğur vd. (2009) yılında, Muğla bölgesinde yayılış gösteren *C. ensiformis* türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini incelemişler. Bu çalışmada *C. ensiformis*’in toprak üstü kısımlarından elde edilen *n*-hekzanlı, kloroformlu, etil asetatlı ve etanollü

özütlerin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu ile *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes* ve *Candida tropicalis* üzerinde incelenmiştir. Ayrıca, antioksidan aktivitesi DPPH metodu ve β - karoten linoleik asit metodu ile bakılmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid bileşikleri Folin–Ciocalteu ve alüminyum nitrat metodu ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, *C. ensiformis*'in etil asetatlı ve etanollü özütlerin kuvvetli bir şekilde serbest radikal temizleme gücüne sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, etil asetatlı ve etanollü özütler yüksek miktarda polifenol ve flavonoid bileşiklerini içermiştir. Bitkiden elde edilen etanollü ve etilasetatlı özütler çok güçlü bir şekilde tüm bakteri suşlarının üremesini inhibe etmiştir.

Özçelik vd. (2009) *C. solstitialis*'ten izole ettikleri 3-asetil solstitiyalin-A bileşiğin antibakteriyal ve antiviral etkisini *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve Herpes Simplex tip-1 üzerinde tespit etmiştir.

Şen vd. (2013) ise *C. stenolepis*, *C. kilaea*, *C. iberica*, *C. cuneifolia*, *C. solstitialis* olmak üzere, 5 farklı *Centaurea* türü üzerinde yaptıkları çalışmada, kapitulum ve kapitulumsuz toprak üstü kısımlardan hazırlanan metanollü özütlerinde DPPH yöntemi ile antioksidan etki, MIC yöntemi ile antimikrobiyal aktivite ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde içeriği araştırılmıştır. Antioksidan testlerinde, askorbik asit standardına göre bu türlerin antioksidan aktivitelerinin düşük olduğu görülmüştür. Ancak bu türler içerisinde diğer türlere kıyasla *C. solstitialis*'in antioksidan aktivitesinin iyi düzeyde olduğu görülmüştür. Ayrıca, *C. solstitialis*'in az miktarda toplam fenolik bileşik içerdiği gösterilmiştir. *C. solstitialis*'in kapitulumlu toprak üstü kısımlarının metanol özütleri deneydeki hiçbir suşa etki göstermezken, kapitulumsuz toprak üstü kısımlarının metanol özütleri *P. aeruginosa*'a karşı düşük düzeyde de olsa etki ettiği tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, antimikrobiyal çalışmasından elde edilen verilere göre, *C. virgata* bitkisi çiçeğinden hazırlanan metanol özütü, *S. aureus* üzerinde 16 mm zon çapı ile, *B. subtilis* ve *E. coli* üzerinde 18 mm zon çapı ve *P. aeruginosa* üzerinde 15 mm zon çapı oluşturarak bu bakteri suşlarının üremesini kuvvetli oranda inhibe etmiştir. *C.*

virgata çiçeğinden elde edilen metanol özüt, tez çalışmasında bulunan diğer bitki özütlerine göre orta seviyede polifenol ve flavonoid bileşiklerini (93.89 mg/mL ve 122.81 µg/mL) içermiştir. Ayrıca, çalışmada hazırlanan metanol özütün GST, GP_x, KAT ve SOD enzimleri ve lipid peroksidasyonu üzerine olan etkileri ilk kez bu tez çalışmasıyla incelenmiştir. Elde edilen doz-cevap grafikleri, *C. virgata* bitki çiçeğinin GST enzimi üzerinde %30 oranında inhibisyon yaptığını göstermiştir. Ayrıca, bitki özütü %20 oranında GP_x enzimini inhibe etmiştir. SOD enzim çalışmasında kullanılan en düşük dozda (0.372 µg/mL) *C. virgata* bitki özütü en fazla %10 oranında SOD enzimini inhibe etmiştir. Bu bitki özütünün KAT enzimi üzerinde ise hiçbir inhibisyon etkisi görülmemiştir. TBARS çalışmasında ise *C. virgata* özütü sadece %10 oranında lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir.

Hazra vd. (2002) yılında *C. intybus* kökünden elde ettikleri etanollü özütün antitümör etkisini *in vivo* ortamında Ehrlich Ascites Carcinoma fareler üzerinde incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, bu bitki özütün 300 ile 700 mg/kg/day doz aralığında antitümör etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Başka bir çalışmada, Ahmed vd. (2003), *C. intybus* bitkisi tohumundan elde edilen metanollü özütün hepatotoksik etkisini, CCl₄ ile muamele edilmiş ve dolayısıyla karaciğer hasarına uğramış olan albino ratlar üzerinde incelemiştir. Bu değerlendirme sonucunda, *C. intybus* tohumundan elde edilen bitki özütü çok kuvvetli oranda karaciğer hasarını önlemiştir.

Nandagopal ve Kumari 2007 yılında, *C. intybus*'un kökünden elde ettikleri petrollü eter, kloroformlu, hekzanlı, etilasetatlı, sulu ve kloromfenikollü özütlerin fitokimyasal özelliklerini değerlendirmişler. Ayrıca, elde edilen özütlerin Gram (+) (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus luteus*) ve Gram (-) (*Escherichia coli* ve *Salmonella typhi*) bakteriler üzerinde olan antibakteriyal etkileri incelenmiştir. Fitokimyasal araştırmalardan elde edilen sonuçlar, *C. intybusun* kökünden elde edilen çeşitli özütlerin yüksek oranda alkaloid, uçucu yağ, serbest yağ, flavonoid, triterpenoid, tannin ve saponin gibi önemli bileşikleri içerdiğini göstermiştir. Ayrıca antimikrobiyal

sonuçlar, bitkinin kökünden izole edilen özütlerin *B. subtilis*, *S. aureus* ve *S. typhi* zerinde kuvvetli oranda antibakteriyal etki yaptığını göstermiştir.

Mahmood vd. (2012) tarafından yapılan bir araştırmada, *C. intybus* tohumundan elde edilen metanollü özütün ve bu özütten izole edilen *n*-btanoll, etilasetatlı, kloroformlu ve *n*-hekzanlı fraksiyonların antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, metanollü özüt ve fraksiyonlarının antimikrobiyal etkileri 4 bakteri suşu (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Pasturella multocida*) ve 3 patojen mantar suşu (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* ve *Rhizopus solani*) zerinde incelenmiştir. Ayrıca, elde edilen özüt ve fraksiyonların toplam fenolik ve flavanoid bileşik içerikleri ve antioksidan etkileri Folin- Ciocalteu, AlCl₃ klorometrik ve DPPH yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *C. intybus* tohumundan izole edilen metanollü özüt ve etil asetatlı fraksiyonun yüksek miktarda polifenol ve flavanoid bileşiklerini içerdiğini ve kuvvetli antioksidan etki gösterdiğini tespit etmiştir. Ayrıca, *C. intybus* tohumundan elde edilen metanollü özüt ve fraksiyonları 4 bakteri suşuna karşı orta seviyede antibakteriyal etki gösterirken, patojen mantar suşları üzerinde oldukca zayıf etki göstermiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında, *C. intybus* bitkisi çiçeğinden elde edilen metanol zt *B. subtilis* (10 mm), *E. coli* (11 mm) ve *S. aureus* (8 mm) suşları üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Ayrıca bu bitki özütü tez çalışmasında bulunan diğerk bitki özütlerine göre orta seviyede polifenol ve flavonoid bileşiklerini (117.67 mg/mL ve 94.23 g/mL) içermektedir. Bu alışmada *C. intybus* bitki çiçeğinden hazırlanan metanollü özütün GST, GP_x, KAT ve SOD enzimleri ve lipid peroksidasyonu üzerinde olan etkisi ilk defa *in vitro* ortamda incelenmiştir. Doz-cevap eğrisi ve IC₅₀ değerlerine göre *C. intybus* ieği özütü, %49 oranında GST enzimini inhibe ederek bu enzimin iyi bir inhibitörü olduğunu göstermiştir. IC₅₀ değeri ise 0.334 g/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca bu bitki özütü %30 oranında GP_x ve SOD enziminin inhibe olmasına neden olmuştur. *C. intybus* ieğinden hazırlanan özüt sadece %5 oranında KAT enzimi ve lipid peroksidasyon inhibisyonuna sebep olmuştur. Sitotoksisite incelemesinden (XTT) elde edilen verilere göre, *C. intybus*'un çiçeğinden hazırlanan zt HL-60 kanser hücrelerinin büyümesini

%69 oranında (IC₅₀ değeri 0.002 µg/mL) inhibe etmesine rağmen MCF-7 meme kanser hücrelerin büyümesinde hiç bir etki göstermemiştir.

Volete vd. 2004 yılında, *Euphorbia* cinsine ait olan *E. pubescens*'den izole ettikleri pubescenol, helioscopinolid-A, helioscopinolid-B ve pubescene-D bileşiklerinin antitümör etkisini MCF-7 (meme kanseri) ve NCI-H460 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre hatları üzerinde araştırmıştır. Çıkan sonuçlar, bu bileşiklerin tüm hücre hatlarının üremesini orta derecede inhibe ettiğini göstermiştir.

Başka bir çalışmada, *E. acanthothamnus*, *E. macroclada* ve *E. rigid*'in toprak üstü kısımlarından elde edilen petrol eterli, asetonlu ve etanollü özütlerin üzerinde yapılan antioksidan çalışmaları, bu bitkilerin yüksek derecede antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir (Barla vd. 2007).

Yapılan başka bir araştırmada, *E. macroclada*'nın toprak üstü kısmından ve lateksinden elde edilen diklorometanlı, etil asetatlı ve metanollü özütlerin sitotoksik etkisini MTT metodu ile MDA-MB-468 meme kanser hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Sonuçlar, diklorometanlı ve etilasetatlı özütlerin kuvvetli oranda kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Sadeghi Aliabadi vd. 2009).

Başka bir çalışmada, *E. hirta*'nın yaprağı, çiçeği ve kökünden elde edilen metanollü özütlerin toplam fenolik ve flavanoid madde miktarları araştırılmış ve DPPH metodu ile özütlerin antioksidan etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, bu özütlerin yüksek miktarda fenol ve flavonoid bileşiklerin içerdiğini ve yüksek derecede serbest radikal süpürücü etkilerini göstermiştir (Basma vd. 2011).

Wang vd. 2012 yılında, *E. helioscopia*'dan elde edilen petroliyum eterli, kloroformlu, etilasetatlı ve *n*-butanollü özütlerin antikanser etkisini insan hepatosellüler karsinoma hücre hattında (SMMC-7721, BEL- 7402, HepG2), gastrik karsinoma hücre hattında (SGC-7901) ve kolorektal kanser hücre hattında (SW480) incelemiştir. Etilasetatlı ve kloroformlu özütler 50-200 µg/mL konsantrasyonlarda tüm kanser hücre hatlarının üremesini inhibe etmiştir.

Başka bir çalışmada, Farhan vd. (2012) *E. macroclada* yaprağı ve kökünden elde edilen etanollü özütün ikincil metabolit içeriklerini klorometrik ve spektrofotometrik yöntemler kullanarak araştırmıştır. Ayrıca, bu bitki kısımlarından elde edilen etanollü özütün antioksidan etkisi DPPH ve H₂O₂ radikal temizleme yöntemi ile incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, bu bitki kısımlarının belli bir oranda terpenoid, flavonoid, tannin, saponin ve alkaloid gibi ikincil bileşikler içerdiğini göstermiştir. Ayrıca, *E. macroclada* yaprağı ve kökünden elde edilen etanollü özütlerin yüksek oranda polifenolik bileşik içerdiği tespit edilmiştir. DPPH ve H₂O₂ radikal temizleme yöntemlerinden elde edilen veriler, bu bitki özütlerinin yüksek oranda serbest radikal temizleme gücüne ve dolayısıyla kuvvetli bir antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Aynı grup 2013 yılında, *E. macroclada* yaprağı ve kökünden elde edilen sulu özütlerin toplam polifenol ve flavonoid içeriklerini ve antioksidan etkilerini araştırıp, elde edilen verileri etanollü özütlerden alınan değerler ile karşılaştırmıştır. Bu kıyaslamada, etanollü özütlerin sulu özütlere göre daha yüksek polifenol ve flavonoid bileşiği içerdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, etanollü özütlerin sulu özütlere göre daha kuvvetli serbest radikal temizleme gücüne sahip oldukları gösterilmiştir.

Hasan vd. (2013) yaptıkları çalışmada, *E. macroclada* bitkisi yaprağından ve kökünden hazırlanan metanollü, etilasetatlı ve sulu özütlerin fitokimyasal içeriğini kolorometrik yöntemler ile, antioksidan ve sitotoksik etkileri ise DPPH ve XTT metodu ile incelemiştir. Fitokimyasal çalışma sonuçları, *E. macroclada* yaprağından ve kökünden elde edilen sulu özütün saponin ve tanin bileşiklerin içerdiğini göstermiştir. Ayrıca, aynı bitki kısımlarının metanollü ve etilasetatlı özütleri yüksek oranda alkaloid, flavonoid, terpenoid ve fenolik bileşikler içerdiği tespit edilmiştir. DPPH verileri, sulu ve metanollü özütlerin etilasetatlı özütlere göre daha kuvvetli antioksidan etkiye sahip olduğu göstermiştir. Bu çalışma, *E. macroclada* yaprağından elde edilen sulu ve metanollü özütlerin çok kuvvetli oranda MCF-7 hücre büyümesinin inhibe ettiğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, *E. macroclada* bitkisi çiçeği ve yaprağından elde edilen metanol özütün antimikrobiyal çalışmasından elde edilen sonuçlarına göre, *E. macroclada* çiçeği özütü *B. subtilis* (11 mm), *E. coli* (10 mm) ve *S. aureus* (9 mm) suşuna karşı inhibisyon

göstermiştir, halbuki aynı bitkinin yaprağı özütü sadece *B. subtilis*'e (12 mm) karşı inhibisyon göstermiştir. Toplam polifenol ve flavonoid bileşik içeriğine göre, *E. macroclada* yaprağı özütü bu bitkinin çiçeği ve diğer bitki özütlerine göre en yüksek polifenol (573.10 mg/mL) ve flavonoid (450.70 µg/mL) bileşimini içermektedir. Bu değerlendirmede, *E. macroclada* çiçeği 143.64 mg/mL polifenol ve 97.63 µg/mL flavonoid bileşimi içermektedir. Enzim çalışma sonuçları ve elde edilen doz-cevap grafikleri değerlendirilmesinde, *E. macroclada* çiçeği özütünün %22 oranında GST enzimin inhibisyonuna sebep olduğu görülmüştür. Halbuki, aynı bitkinin yaprak özütü GST enzimini sadece %10 oranında inhibe ettiği isbatlanmıştır. Ayrıca, bu bitkinin çiçeği ve yaprağından hazırlanan özütler GPx enzimini sırasıyla %30 ve %20 oranında inhibe ettiği görülmüştür. *E. macroclada* çiçeği özütü KAT enzimini sadece %10 oranında inhibe ederken, aynı bitkinin yaprağı KAT enzimini %40 oranında inhibe etmiştir. Ayrıca, bu bitkinin çiçek özütü %30 oranında SOD enzimini inhibe etmiştir. Aynı bitkinin yaprağı ise %25 oranında bu enzimin inhibisyonuna neden olmuştur. TBARS deneyinden elde edilen veriler, *E. macroclada* çiçeğinin % 30 oranında lipid peroksidasyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Halbuki aynı bitkinin yaprağının sadece % 5 oranında lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca, *E. macroclada* yaprağından hazırlanan metanol özütü HL-60 kanser hücrelerinin büyümesini %65 oranında inhibe etmiştir. IC₅₀ değeri ise 0.027 µg/mL olarak bulunmuştur. Ama aynı bitki özü, MCF-7 meme kanser hücrelerin büyümesi üzerine hiç bir etki yapmamıştır.

Pleşca-Manea vd. 2002 yılında, kumarin bileşimini içeren *M. officinalis* özütünün etkisini, petrol yağı ile ağır inflamasyona uğrayan erkek tavşanların tedavisinde kullanmıştır. Deney sonunda bu bitkinin kuvvetli anti inflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermişler.

Başka bir araştırmada, Fazly Bazzaz ve Harirzadeh (2003) İran'ın kuzey doğusundan toplanan 306 tane bitki türünün *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal etkilerini araştırmışlar. Araştırma sonucunda, *M. officinalis*'ten elde edilen metanollü özüt sadece

Morganella morganii suşun üremesini engellemiştir, bitki özütü diğer suşlara karşı hiçbir inhibisyon etki göstermemiştir.

Pourmorad vd. 2006 yılında, İran'ın kuzey bölgesinden toplanan *M. Officinalis*'in tüm kısımlarından elde edilen metanollü özütlerinin toplam fenol ve flavonoid bileşik miktarını ve serbest radikal temizleme gücünü incelemiştir. Sonuç olarak bu bitkinin yüksek miktarda fenol ve flavonoid içerdiğini ve kuvvetli bir şekilde serbest radikal temizleme gücüne sahip olduğunu göstermiştir.

Tez kapsamında antimikrobiyal deneyinde, *M. officinalis* bitki çiçeğinden hazırlanan metanol özütü sadece *S. aureus* (10 mm zon çapı ile) bakteri suşun üremesini inhibe etmiştir. Toplam polifenol ve flavonoid bakımından *M. officinalis* tezde çalışılan diğer bitki özütlerine göre düşük oranda polifenol (44.01 mg/mL) ve flavonoid (55.89 µg/mL) bileşiğini içerilmesi görülmüştür. Enzim çalışmalarında elde edilen doz-cevap grafikleri incelenmesinde, *M. officinalis* çiçeği özütünün GST enzimi üzerinde sadece %23 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca, grafik değerleri bu bitki özütünün GPx enzimini sadece %16 oranında inhibe ettiğini göstermiştir. *M. officinalis* çiçek özütünün KAT ve SOD enzimi üzerinde ise hiçbir inhibisyon etkisi görünmemiştir. TBARS deney sonuçları ise bu bitki özütünün lipid peroksidasyonunu sadece %5 oranında inhibe ettiğini göstermiştir.

Mudassir ve Sidney 2004 yılında, *Z. Fabago*'nun tüm kısımlarından elde edilen metanollü özütün antimikrobiyal etkisini *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Sh. dysentrin*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae* ve *C. albicans* üzerinde agar disk difüzyon metodu ile incelemiştir. Sonuçlar *Z. fabago*'nun *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* suşlarına karşı kuvvetli antimikrobiyal ve antifungal etkisinin olduğunu göstermiştir.

Yu Lin Feng vd. 2007 yılında, *Z. Fabago*'nun kabuğundan elde ettikleri etanollü özütten 27-Nor-triterpenoid glikozit bileşiğini izole edip ve antitümör aktivitesini Eca-109 insan hücre hattı üzerinde MTT metodu ile incelemiştir. Elde edilen sonuç, bu bileşiğin Eca-109 hücre büyümesini kuvvetli şekilde inhibe ettiğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, *Z. fabago* bitki meyvesi ve yaprağından elde edilen metanol özütün antimikrobiyal deneyinden elde edilen sonuçlara göre, *Z. fabago* meyve özütü *B. subtilis* (9 mm), *E. coli* (10 mm), *S. aureus* (12 mm) ve *P. aeruginosa* (7 mm) suşuna karşı inhibisyon göstermiştir. Aynı bitkinin yaprağı özütü de *E. coli* (9 mm) ve *S. aureus* (11 mm)'a karşı inhibisyon göstermiştir. Toplam polifenol ve flavonoid bileşik içeriklerine bakıldığında, *Z. fabago* meyvesi özütü bu bitkinin yaprağı ve diğer bitki özütlerine göre en düşük polifenol (48.40 mg/mL) ve flavonoid (28.96 µg/mL) bileşiklerine sahip olduğu görünmüştür. Bu değerlendirmede, *Z. fabago* yaprağı 114.13 mg/mL polifenol ve 181.47 µg/mL flavonoid bileşiği içerdiği saptanmıştır. Enzim çalışması sonuçları ve elde edilen doz-cevap grafikleri incelemesinde, *Z. fabago* meyvesinden hazırlanan özütün %50 (IC₅₀ değeri 0.447 µg/mL) oranında GST enzimini inhibe etmesi iyi bir inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak bu değerlendirmede aynı bitkinin yaprak özütü GST enzimini sadece %20 oranında inhibe etmiştir. Ayrıca, bu bitkinin meyve özütü GPx enzimini %25 oranında inhibe ederken, yaprağından hazırlanan özüt aynı enzimi sadece %18 oranında inhibe etmiştir. *Z. fabago* meyvesi ve yaprağından hazırlanan metanol özütleri SOD enzimi üzerinde hiçbir inhibisyon etki göstermediği halde, KAT enzimi çalışmasından elde edilen doz-cevap grafikleri *Z. fabago* meyvesi özütünün %50 oranında KAT enzimin inhibe ettiğini göstermiştir. Böylece bu bitkinin meyve özütü çalışılan diğer bitki örneklerine göre KAT enziminin en iyi inhibitörü olarak kendini göstermektedir. IC₅₀ değeri ise 0.083 µg/mL olarak bulunmuştur. Ancak değerler aynı bitkinin yaprak özütünün KAT enzimini sadece %12 oranında inhibe ettiğini göstermiştir. TBARS deneyinden elde edilen sonuçlar ise, *Z. fabago* meyvesinden elde edilen özütün lipid peroksidasyonu üzerinde %25 oranında inhibisyon yaptığını göstermiştir. Ayrıca, aynı bitkinin yaprak özütü lipid peroksidasyonu üzerinde sadece %10 oranında inhibisyon etki yapmıştır. Sitotoksiste deneylerinde elde edilen veriler göre, *Z. fabago* meyvesinde elde edilen metanollü özüt HL-60 ve MCF-7 kanser hücrelerinin büyümesinde hiç bir etki göstermemiştir.

Sonuç olarak; Türkiye florasında yetişen bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkileri bakımından değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada amaç günümüz tedavi sürecinde hızlı çoğalan hücre profili gösteren

romatizma, kanser ve diğ er proliferatif hastalıklarda kullanılan kemoterapötiklerin hedefe özgü etkinliklerini arttırmak için hedef dışı enzim ve hücresel savunma mekanizmalarını kontrol edip düzenleyecek d    k toksisitede doğ l kaynaklara dayalı kemoterap tiğ  destekleyecek fitokimyasalların tespit edilmesidir. Böylelikle proliferatif hastalıklarda yaygın kullanımı olmasına rağ men doza bağlı sistemik toksisitesi yüksek antikanser ilaçların etkinliklerini bitkisel destekli arttırırken sistemik zararlarını azaltmak uzun vadede bu amaç kapsamında hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H. 1984. "Catalase *in vitro*." Methods Enzymology 105; 121-6.
- Ahmed, F., Ansaruzzaman, M., Haque, E., Rao, M.R. and Clemens, J.D. 2001. Epidemiology of postshigellosis persistent diarrhea in young children. *Pediatr Infect Dis Journal*, 20; 525-530.
- Ahmed, B., Al-Howiriny, T. and Siddiqui, A.B. 2003. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*, *Journal of Ethnopharmacology*, 87; 237-240.
- Akbar, S., Fries, D.S. and Malone, M.H. 1992. Effect of various pretreatments on the hypothermic activity of repin in naive rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 49(2); 91-99.
- Altuner, E.M. and Çetin, B. 2009. Antimicrobial activity of *Thuidium delicatulum* (Bryopsida) extracts. *Kafkas Üniversitesi. Fen Bilimleri. Enstitüsü. Dergisi.*, 2(2); 85-92.
- Altundağ, E. and Öztürk, M. 2011. Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey, *Procedia Soc Behav Sci* 19; 756-777.
- Altan, N., Sepici Dinçel, A. ve Koca, C. 2006. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi Turkish Journal of Biochemistry*, 31(2); 51-56.
- Angelina, Q., Pelcastre, A. and Dolores, J. 1999. Antitumoral of pyrimidine derivatives of sesquiterpen lactones, *Journal of Pharmacology Pharmaceutical Science*, 3; 108-112.
- Anonim. 2013. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. Web Sitesi: www.turkherb.ibu.edu.tr. Erişim Tarihi: 19.02.2013.
- Anonim. 2012. Web Sitesi: <http://www.ozgurdogan.net>. Erişim Tarihi: 25.12.2012.
- Anonim. 2012. Web Sitesi: www.sifalioylar.org. Erişim Tarihi: 25.12.2012.
- Anonymous. 2013. wikipedia . Web Sitesi: <http://en.wikipedia.org>. Erişim Tarihi: 10.06.2013.
- Anonymous. 2013. Web Sitesi: <http://www.biologie.uni-freiburg.de>. Erişim Tarihi: 10.06.2013.
- Arif, R., Küpeli, E. and Ergun, F. 2006. The Biological activity of *Centaurea* L. Species. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 17(4); 149-164.
- Armstrong, R.N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol*, 10, 2-18.

- Athar, M., Back, J.H., Tang, X.W., Kim, K.H. and Kopelovich, L. 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology Applied Pharmacology*, 224; 274-283.
- Barla, A., Birman, H., Kultur, S. and Oksus, S. 2006. Secodary metabolites from *Euphorbia helioscopia* and their vasodepressor activity, *Turkish Journal of Chemistry*, Tubitak, 30; 325-35.
- Basma, A.A., Zakaria, Z., Latha, L.Y. and Sasidharan, S. 2011. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L., *Asian Pac J Trop Med*, 386-390.
- Battistoni, A., Folcarelli, S. and Cervoni, L. 1998. Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase. pH-Dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 273; 5655-5661.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri, 480, Ankara.
- Benli, M. ve Yiğit, N. 2005. Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab on-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3 (8); 1-8.
- Berridge, M.V., Herst, P.M. and Tan, A.S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11; 127-152.
- Borges, F., Fernandes, E. and Roleira, F. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem*, 9; 195-217.
- Cai, Y.Z., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74; 2157-2184.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. and Corke, H. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 78; 2872-2888.
- Cadenas, E. and Davies, K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med*, 29; 222-230.
- Chelikani, P., Carpena, X., Fita, I. and Loewen, P.C. 2004. An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *J Biol Chem*, 278; 31290-31296.
- Conklin, K.A. 2004. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*, 3(4); 294-300.
- Coruh, N., Sagdicoglu Celep, A.G., Ozgokce, F. and Iscan, M. 2007. Antioxidant capacities of *Gundelia tournefortii* L. extracts and inhibition on glutathione-S-transferase activity. *Food chemistry*, 100; 1249-1253.

- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 10; 564-582.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. and Snader, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natatural Product*, 60; 52-60.
- Csupor, D., Blazsó, G., Balogh, A. and Hohmann, J. 2010. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127; 193-195.
- Çakılcıoğlu, U. and Türkoğlu, I. 2010. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132; 165-175.
- Carr, A., McCall, M. R. and Frei, B. 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol*, 20; 1716-1723.
- Demirtas, I., Sahin, A., Ayhan, B., Tekin, S. and Telci, I. 2009. Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. Sub sp. linearis. *Rec. Nat. Prod*, 3; 104-109.
- Dilsiz, N. 2009. *Moleküler Biyoloji 2. Baskı*”, Palme yayıncılık, Ankara, 197-198.
- Drevet, J.R. 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Molecular Cell Endocrinology*, Baskıda.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, 82; 47-95.
- Duarte, T.L. and Lunec, J. 2005. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, 39(7); 671-86.
- Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M. ve Uğurlu, E. 1999. *Artemisia absinthium* L. (Pelin)’un antimikrobiyal aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, 23; 377-384.
- Dweck, A.C. 2009. The internal and external use of medicinal plants. *Clinics in Dermatology*, 27; 148-158.
- Eaton, D.L. and Bammler, T.K. 1999. Concise review of the glutathione-S-transferases and their signnigance to toxicology. *Toxicology Science*, 49; 156-164.
- Ebadi, M. 2007. *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*, CRC/Taylor and Francis.
- Ertürk, Ö. ve Demirbağ, Z. 2003. *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Çevre Koruma*, 12 (47); 27-31.
- Ertürk, Ö., Katı, H., Yaylı, N. and Demirbağ, Z. 2006. Antimicrobial properties of *Silene multifida* (Adams) Rohrb plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 30; 17-21.

- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. and Grodsky, G.M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. 599-622.
- Farhan, H., Rammal, H., Hijazi, A., Hamad, H. and Badran, B. 2012. Phytochemical screening and extraction of polyphenol from stems and leaves of a Lebanese *Euphorbia macrolada* schyzoceras Boiss. Annals of Biological Research, 3(1); 149-156.
- Farhan, H., Rammal, H., Hijazi, A., Daher, A., Reda, M., Annan, H., Chokr, A., Bassal, A. and Badran B. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of a Lebanese plant *Euphorbia macroclada* schyzoceras. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(7); 542-548.
- Fattman, C.L., Enghild, J.J., Crapo, J.D., Schaefer, L.M., Valnickova, Z. and Oury, T.D. 2000. Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. Biochem Biophys Res Commun, 275; 542-8.
- Fazly Bazzaz, B.S. and Haririzadeh, G. 2003. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology, 41(8); 573-583.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S. 1982. Organic Chemistry, 2nd ed, Willard Grant Press, Boston, Mass.
- Fresco, P., Borger, F., Diniz, C. and Marques, M.P.M. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. Med. Res. Rev., 26; 747-766.
- Geller, B. L. and Winge, D. R. 1984. Methods Enzymology, 105:105.
- Ghafourifar, P. and Cadenas, E. 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends Pharmaceutical Science, 26; 190-195.
- Greenlee, R.T., Murray, T. and Bolden, S. 2000. Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 50; 7-33.
- Guengerich, F.P. 1990. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 25; 97-153.
- Gueritte, F. and Fathy, J. 2005. Anticancer agents from natural products, Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 123-136.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer, K.H.C. 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 11.
- Gürtünç, E. 2007. Meme kanserli hastalarda CYP19 geni kodon 39 Trp/Arg polimorfizminin ve genotip dağılımının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry, 249(22-25); 7130-7139.

- Hajjeh, R.A., Reingold, A., Weil, A., Shutt, K., Schuchat, A. and Perkins, B.A. 1999. Toxic shock syndrome in the United States: Surveillance update, 1979-1996. *Emerg. Infect. Dis*, 5; 807-810.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 2001. *Free radicals in biology and medicine*. (3rd ed.). Oxford Science Publications, 22-24.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.
- Han, X.Z., Shen, T. and Lou, H.X. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *Internatinal Journal of Molecular Science*, 8; 950-988.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (1); 57-70.
- Hassan, R., Hussein, F., Hawaraa, M., Akram, H., Ahmad, K., Ahmad, D. and Bassam, B. 2013. Antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical screening of two Lebanese medicinal plants, *International Research Journal of Pharmacy*, 4(5); 132-136.
- Hathcock, J.N., Azzi, A., Blumberg, J., Bray, T., Dickinson, A. and Frei, B. 2005. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr*, 81(4); 736-45.
- Hazra, B. and Sarkar, R. 2002. Tumour inhibitory activity of chicory root extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice, *Fitoterapia*, 73; 730-33.
- Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. 2000. Flavonols, flavones, and flavanols-nature occurrence, and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80; 1081-1093.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z. and Zhang, Y. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1); 1-20.
- Hube, B. and d'Enfert, C. 2007. *Candida: Comparative and functional genomics*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Huh, Y.S., Hong, T.H. and Hong, W.H. 2004. Effective extraction of oligomeric proanthocyanidin (OPC) from wild grape seeds. *Biotechnol Bioproc E*, 9; 471- 475.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I. and Utsumi, K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, 10; 2495-505.
- Iscan, M., Coban, T., Bulbul, D., Eke, B. C., Aygormez, S. and Berberoglu, U. 1998. Xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in normal and neoplastic human breast tissue. *European Journal of Drug and Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(4); 497-500.

- Isgor, Y.G., Iscan, M., Ozturk, H.S. and Durak, I. 2008. Effects of water soluble garlic extract on human leukemia hl60 cell lines. Turkish Journal of Biochemistry, 33(3); 78-84.
- Isgor, B.S., Coruh, N. and Iscan, M. 2010. Soluble glutathione-S-transferases in bovine liver: Existence of GST T2. Journal of Biological Sciences , 10(7); 667-675.
- Jakobek, L., Seruga, M., Novak, I. and Medvidovic-Kosanovic, M. 2007. Flavonols, phenolic acids, and antioxidant activity of some red fruits. Deut Lebensm-Runsch, 103; 369-378.
- Jassbi, A.R. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. Phytochemistry, 67; 1977-1984.
- Jones, S.B. and Luchsinger, A.E. 1986. Plant Systematics, McGraw Hill Book Co, New York.
- Jones, D.P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J. Y., Lynn, M. J. and Sternberg, P. 2000. Redox state of glutathione in human plasma. Free Radic. Biol. Med, 28; 625-635.
- Khammar, A. and Djeddi, S. 2012. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* Species. European Journal of Scientific Research, 84(3); 398-416.
- Khan, M.A., Tania, M., Zhang, D. and Chen, H. 2010. Antioxidant enzymes and cancer. Chin J Cancer Res, 22(2); 87-92.
- Kirby, J.C., Bauer, A.W., Sherris, W.M.M. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Journal of Clinical Pathology. 36; 493-496.
- Klotz, M.G., Klassen, G.R. and Loewen, P.C. 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. Mol. Biol. Evol, 14; 951-958.
- Klotz, M.G. and Loewen, P.C. 2003. The molecular evolution of catlatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. Mol. Biol. Evol, 20; 1098-1112.
- Kojo, S. 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. Curr Med Chem, 11; 1041-64.
- Lovkova, M. 1981. Alkaloids Biosynthesis and Metabolism in Plants, Moscow.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193; 265-275.
- Mahmood, N., Zubaira, M., Rızwana, K., Rasoola, N., Shahid, M. and Uddin, V. 2012. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical analysis of *Cichorium intybus*

- seeds extract and various organic fractions. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(4); 1145-1151.
- Marchetti, M. and Resnick, L. 2009. Sulindac enhances the killing of cancer cells exposed to oxidative stress. PLoS ONE, 4(6); 5804.
- Marklund, S. 1980. Distribution of Cu/Zn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. Acta Physiol Scand Suppl, 492; 19-23.
- Marshall, N.J., Goodwin, C.J. and Holt, S.J. 1999. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation, 5; 69-84.
- Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. Journal of Nutritional Biochemistry, 16; 577-586.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and De Castro, I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry, 32; 595-603.
- Mesquita, M.L., Paula, J.E., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F. and Espindola, L.S. 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology, 123(3); 439-445.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H. and Truscott, T.G. 2001. The interaction of dietary carotenoids with radical species. Arch Biochem Biophys, 385; 13-19.
- Mudassir A. Z. and Sidney A.C.J. 2004. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan, Journal of Ethnopharmacology, 96; 331-334.
- Murray, P.R., Drew, W.L., Kobayashi, G.S. and Thompson, J.H. 1990. Medical Microbiology. Pub. Wolfe Publishing, USA.
- Nandagopal, S. and Ranjitha Kumari, B.D. 2007. Phytochemical and antibacterial studies of Chicory (*Cichorium intybus* L.) - A multipurpose medicinal plant, Advance Biology Research, 1; 17-21.
- Nergrette, R., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B.K., Breitmaier, E. and Eckhardt, G. 1993. Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. Journal of Ethnopharmacology, 40(3); 149-153.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. and Noguchi, N. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochemical and Biophysical Research Communications, 338; 668-676.
- Nogueira, C.W., Zeni, G. and Rocha, J.B.T. 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. Chem. Rev., 104; 6255-6285.

- Omulokoli, E., Khan, B. and Chhabra, S.C. 1997. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 56; 133-137.
- Ohkawa, S., Fukatsu, K., Miki, S., Hashimoto, T., Sakamoto, J., Doi, T., Nagai, Y. and Aono, T. 1979. 5-aminocoumarans: dual inhibitors of lipid peroxidation and dopamine release with protective effects against central nervous system trauma and ischemia. *J Med Chem*, 40; 559-573.
- Oral, D.Ç. 2007. Konya ilinde kullanılan halk ilaçları üzerinde etnobotanik araştırmalar, pp. 49-50, M. Sc. Thesis, Gazi University Health Science Institute, Ankara.
- Özbilgin, S. and Saltancitoğlu, G. 2012. Uses of some *Euphorbia* species in traditional medicine in Turkey and their biological activities. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, 9(2); 241-256.
- Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoğlu, T. and Yeşilada, E. 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiological Research*, 164; 545-552.
- Özçimen, A. 2005. Steroid' in HL-60 (insan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi, Hacettepe Üniversitesi, Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD, Ankara.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F. 2003. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, 333; 19-39.
- Perry, J.J.P., Shin, D.S., Getzoff, E.D. and Tainer, J.A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804; 245-262.
- Pleşca-Manea, L., Parvu, A.E., Parvu, M., Taamaş, M., Buia, R. and Puia, M. 2002. Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phytotherapy Research*, 16; 316-319.
- Pourmand, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11); 1142-1145.
- Rastogi, R.P. and Mehrotra, B.N. 1994. Compendium of Indian medicinal plants. Rastogi, R.P. (Eds.). Orient Longman Ltd., Madras, pp: 74.
- Ratanachoo, K., Gascoyne, P. R. C. and Ruchirawat, M. 2002. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis, *BBA*, 1564; 449-558.
- Ren, W.Y., Qiao, Z.H., Wang, H.W., Zhu, L. and Zhang, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23; 519-534.
- Ryan, K.J. and Ray, C.G. (editors). 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill, New York.

- Sadeghi Aliabadi, H., Sajjadib, S.E. and Khodamoradic, M. 2009. Cytotoxicity of *Euphorbia macroclada* on MDA-MB-468 breast cancer cell line, Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 5(2); 103-108.
- Samuelsson, G. 1999. Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. 4th ed., Stockholm, Swedish Pharmaceu-tical Press.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28; 49-55.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J Agric Food Chem., 53; 7749 -7759.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, Biochem J., 360; 1-16.
- Shen, D., Dalton, T.P., Nebert, D.W. and Shertzer, H.G. 2005. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. J. Biol. Chem., 280; 25305-25312.
- Shoeb, M. 2006. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh Journal of Pharmacology, 1; 35-41.
- Silici, S. and Koc, A.N. 2006. Comparative study of *in vitro* methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Letters in Applied Microbiology, 43; 318-324.
- Singla, A.K. and Pathak, K. 1990. Phytochemistry of *Euphorbia* species, Fitoterapia, 6; 483-516.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H. and Hagen, T. 2004. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. Curr Med Chem, 11; 1135-1146.
- Stahl, W. and Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Mol Aspect Med, 24; 345-51.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H. and Sun, M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry, 102; 938-953.
- Şekeroğlu, M.R., Şahin, H., Dülger, H. and Algün, E. 2000. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. Clinical Biochemistry, 33; 669-674.

- Şen, A., Bitiş, L., Birteksöz-Tan, S. and Bulut, G. 2013. *In vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of some *Centaurea* L. species. Marmara pharmaceutical Journal, 17; 42-45.
- Tang, Q., Su, Z., Han, Z., Ma, X., Xu, D., Liang, Y., Cao, H., Wang, X., Qu, X., Hoffman, A., Liu, H., Gu, D. and Qiu, D. 2012. LC-MS method for detecting prostratin in plant extracts and identification of a high-yielding population of *Euphorbia fischeriana*, Phytochem Lett, 5; 214-218.
- Tannock, I.F. and Hill, R.P. 1992. The Basics Science of Oncology.2 nd Ed. New York, Mc Graw-Hill.
- Tareen, R.B., Mohammad, K. and Zaidi, M.I. 2002. Plant communities, species diversity, medicinal plants and soil water relationship of the watercourses of Shireen valley Juniper ecosystem Ziarat, Balochistan, Res J Uni Balochistan, 1; 41-49.
- Taysi, S., Kocer, I., Memisogullari, R. and Kiziltunc, A. 2002. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behcet's disease. Ann Clin Lab Sci, 32(4); 377-382.
- Townsend, D.M. and Tew, K.D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene, 22; 7369-7375.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. and Chiarpotto, E. 2004. Oxidative stress and cell signaling. Curr Med Chem, 11; 1163-1182.
- Ugur, A., Emin Durub, M., Ceylanc, O., Saracd, N., Varola, O. and Kivrakb, I. 2009. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor. (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey), Natural Product Research, 23(2); 149-167.
- Valente, C., Pedro, M., Duarte, A., Nascimento, M.S.J., Abreu, P.M. and Ferreira, M.J.U. 2004. Bioactive diterpenoids, a new jatrophone and two ent-abietanes, and other constituents from *Euphorbia pubescens*, Journal of Natural Product, 67; 902-904.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.H. and Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Cell Biochemistry, 266; 37-56.
- Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T.D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem., 12; 1161-1208.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biol Inter, 160; 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D, Mazura, M. and Telser., J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human

- disease. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39; 44-84.
- Vance, C.K. and Miller, A.F. 1998. Spectroscopic comparisons of the pH dependence of Fe-substituted (Mn) superoxide dismutase and Fe-superoxide dismutase. Biochemistry, 37; 5518-5527.
- Van Haften, R.I., Evelo, C.T., Penders, J., Eijnwachter, M.P., Haenen, G.R. and Bast, A. 2001. Inhibition of human glutathione-S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. Biochim Biophys Acta, 1548; 23-28.
- Varotto, S., Lucchin, M. and Parrin, P. 2000. Immature embryos culture in Italian red Chicory (*Cichorium intybus*), Plant Cell Tiss, Org. Cult, 62; 75-77.
- Vorbach, C., Harrison, R. and Capecchi, M.R. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. Trends Immunology, 24; 512-517.
- Walsh, T. J., A. Groll, J., Hiemenz, R., Fleming, E., Rolilides, A. and Anaissie., E. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin. Microbiol. Infect, 10; 48-66.
- Wang, J., Fong, C., Tzang, C., Xiao, P., Han, R. and Yang, M. 2009. Gene expression analysis of human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation and cytotoxicity induced by natural and synthetic retinoids, Life Sciences, 84; 576-583.
- Wang, Z.Y., Liu, H.P., Zhang, Y.C., Guo, L.Q., Li, Z.X. and Shi, X.F. 2012. Anticancer potential of *Euphorbia helioscopia* L. extracts against human cancer cells, Anat Rec, 295; 223-233.
- Wei, H.X., Gao, W.Y., Tian, Y.K., Guan, Y.K. Huang, M.H. and Cheng, D.L. 1997. New eudesmane sesquiterpene and thiophene derivatives from the roots of *Rhaponticum uniflorum*. Pharmazie, 52(3); 245-247.
- Wollgast, J. and Anklam, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res. Int, 33; 423-347.
- Woisky, R. and Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apic. Res, 37; 99-105.
- Yeşil, Y. 2007. Kürecik (Akçadağ/Malatya) bucagında etnobotanik bir araştırma, M. Sc. Thesis, Istanbul University Health Science Institute, İstanbul, pp. 109-110.
- Yesilada, E. 2002. Biodiversity in Turkish folk medicine. In: Sener, B. (Ed.), Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, UK. pp. 119-135.

Yu-Lin, F., He-Ran, L., Li-Zhen, X., Shi-Lin, Y. 2007. 27-Nor-triterpenoid glycosides from the barks of *Zygophyllum fabago* L. Journal of Asian Natural Products Research, 9(6); 505-510.

EKLER

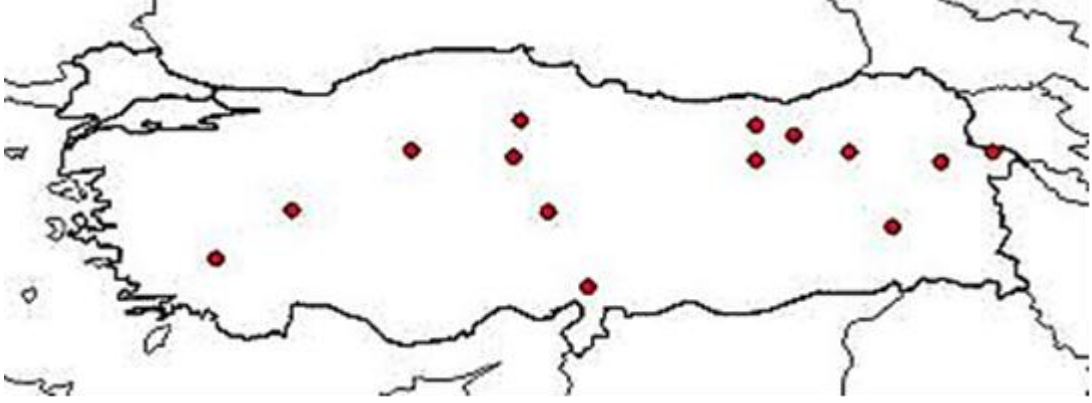
EK 1 *Centaurea virgata* Lam. 'nın Türkiye deki yayılış alanları



EK 2 *Cichorium intybus* L.' un Türkiye'deki yayılış alanları



EK 3 *Euphorbia macroclada* Boiss.'nın Türkiye'deki yayılış alanları



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM

Doğum Yeri : Tebriz-İRAN

Doğum Tarihi : 21.03.1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, Farsça, Azerice, Arapça

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sema Özel Okulları (1999)

Lisans : Tebriz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı
(2000-2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
(2006-2008)

Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
(2008-2014)

SCI Yayınlar

SHOMALİ MOGHADDAM,N., ISGOR, S.B., ISGOR,Y.G., GEVEN, F. and YİLDİRİM, O. (2014). The Evaluation of Inhibitory Effects of Selected Plant Extracts on Antioxidant Enzymes. Fresenius Environmental Bulletin (Baskı altında).

KOÇ, S., İŞGÖR, S.B., İŞGÖR,Y.G., **SHOMALİ MOGHADDAM, N.,** ALTUNER, E.M., YILDIRIM, O. (2014). The Potential Medicinal Value of Plants from Asteraceae Family with Antioxidant Defense Enzymes as Biological Targets. Pharmaceutical Biology (Baskı altında).

Hakemli Dergiler

GÜNEŞ,M.G., İŞGÖR, S.B., İŞGÖR,Y.G., **SHOMALİ MOGHADDAM, N.,** GEVEN, F and YILDIRIM, O. (2014). The Effects Of *Eryngium campestre* Extracts on Glutathione-S-transferase, Glutathione peroxidase and Catalase Enzyme Activities. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences (Baskı altında).

Uluslararası Kongreler

GÜL,N. , SHOMALI,N and ÖZLÜKL,A. (2009). Lectin binding midgut cells of *Agrotis segetum* 34 th FEBS Congress Molecular Machines, July 4-7, 2009, Praque, Chech Republic (Bildiri).

Ulusal Kongreler

SHOMALI, N. , ISGOR,B.S. , ISGOR,Y.G., GEVEN,F. and YILDIRIM.O. (2012). Evaluating the Effects of *Heliotrpium europaeum*, *Carlina oligocephala* and *Echinops ritro* Extracts on Cytosolic Defense (IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık 2012, Uludağ Üniversitesi, Bursa) (Bildiri).

KOÇ, S., İŞGÖR, S.B., İŞGÖR,Y.G., **SHOMALİ MOGHADDAM, N.**, ALTUNER, E.M., YILDIRIM, O. (2013). The Analysis of Asteraceae Species for Antioxidant Effectiveness by Chemical Methods and Their Antimicrobial Properties (XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2013, Kuşadası) (Bildiri).