



T.C.

ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ERZİNCAN KELTATI (*Alchemilla erzincanensis*) BİTKİSİNİN
YAĞ ASİDİ İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ, ANTİOKSİDAN ve
ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ümit Yaşar KAYIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZİNCAN

2021

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ERZİNCAN KELTATI (*Alchemilla erzincanensis*) BİTKİSİNİN
YAĞ ASİDİ İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ, ANTİOKSİDAN ve
ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Ümit Yaşar KAYIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet AKTAŞ

ERZİNCAN
2021

TEZ KABUL SAYFASI

Bu sayfa için Enstitü web sitesindeki form kullanılacaktır. Savunma sınavından sonra jüri üyelerine imzalatılarak basılacak tezlere eklenecektir.



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uygunluğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılamadığını, tezin herhangi bir kısmının başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Ümit Yaşar KAYIŞ



İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.2. Antioksidanlar.....	5
2.2.1. Enzimatik antioksidanlar	8
2.2.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	8
2.2.1.2. Katalaz (CAT).....	8
2.2.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)	8
2.2.2. Non-enzimatik antioksidanlar.....	9
2.2.2.1. Vitamin A (β-karoten)	9
2.2.2.2. Vitamin C (Askorbik asit).....	10
2.2.2.3. Vitamin E (Tokoferoller)	11
2.2.2.4. Karotenler	12
2.2.2.5. Fenolik bileşikler	13
2.2.2.6. Flavonoidler	15
2.3. Esansiyel Yağlar	16
2.3.1. Terpen Türevleri	17
2.4. Kanser	18
2.5. <i>Alchemilla erzincanensis</i>	20
3. MATERYAL ve METOD	23

3.1. Materyal	23
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	23
Bu tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1.'de verilmiştir	23
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	24
Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler Tablo 3.2.'de verilmiştir.....	24
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	25
3.1.3.1. Toplam fenolik miktar tayini	25
3.1.3.2. Toplam flavonoid miktar tayini	25
3.1.3.3. DPPH• radikal giderme aktivitesi.....	25
3.1.3.4. ABTS ^{•+} radikal giderme aktivitesi	26
3.1.3.5. Metal şelatlama kapasite tayini.....	26
3.2. Metod	26
3.2.1. <i>Alchemilla erzincanensis</i> bitkisinin toplanılması, kurutulması ve ekstraksiyonu	26
3.2.2. Antioksidan aktivite tayin metotları.....	27
3.2.2.1. DPPH• radikalini giderme aktivitesi tayini	27
3.2.2.2. ABTS ^{•+} radikal giderme aktivitesi tayini.....	28
3.2.2.3. Metal şelatlama kapasite tayini.....	29
3.2.3. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini	30
3.2.3.1. Toplam fenolik miktarı tayini	30
3.2.3.2. Toplam flavonoid miktarı tayini	32
3.2.4. <i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün yağ asidi profilinin belirlenmesi	33
3.2.5. Hücre kültürü çalışmaları.....	34
3.2.5.1. Hücre kültürü	34
3.2.5.3. Hücrelerin pasajlanması.....	35
3.2.5.4. Hücrelerin dondurulması	35
3.2.5.5. Hücre sayımı	36
3.2.6. Antiproliferatif aktivite testleri	37
3.2.6.1. Ekstrelerin hazırlanması	37
3.2.6.2. Hücre canlılığı ölçümü.....	37
4. BULGULAR.....	40
4.1. Antioksidan Aktivite Bulguları.....	40
4.1.1. DPPH• radikal giderme aktivitesi bulguları.....	40
4.1.2. ABTS ^{•+} radikal giderme aktivitesi bulguları.....	41
4.1.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları	42

4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı Bulguları.....	42
4.2.1. Toplam fenolik miktarı bulguları.....	42
4.2.2. Toplam flavonoid miktarı bulguları.....	43
4.3. <i>Alchemilla erzincanensis</i> Türünün GC-MS Analiz Bulguları	43
4.4. <i>Alchemilla erzincanensis</i> Türünün Antiproliferatif Aktivite Araştırma Bulguları	46
5. SONUÇ VE TARTIşMA	48
5.1. Fenolik ve Flavonoid İçerik Sonuçları.....	48
5.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları	49
5.3. Ya� Asidi İçeriği Sonuçları	50
5.4. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları.....	53
KAYNAKLAR	57
�ZGE�Mİř	65

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 2.1.	Bazı serbest radikal kaynakları	4
Tablo 2.2.	Reaktifoksijen türleri ve serbest olmayan radikaller	5
Tablo 2.3.	Antioksidanların sınıflandırılması	7
Tablo 3.1.	Kullanılan alet ve cihazlar	23
Tablo 3.2.	Antioksidan aktivite ve fenolik içerik tayininde kullanılan kimyasallar.....	24
Tablo 4.1.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün metanol ve su ekstraktlarının ve standart antioksidan bileşiklerinin DPPH radikal giderme kapasiteleri.	41
Tablo 4.2.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstraktları'nın ve standart antioksidan bileşiklerin ABTS radikal giderme kapasiteleri ...	42
Tablo 4.3.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstraktlarının ve EDTA'nın metal şelatlama kapasiteleri	42
Tablo 4.4.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri.....	43
Tablo 4.5.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstraktlarının toplam flavonoid madde içerikleri.....	43
Tablo 4.6.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün esansiyel yağ profili	45
Tablo 4.7.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstraktlarının MCF-7 ve MDA-MB 453 kanser hücre hatları üzerindeki IC ₅₀ değerleri	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	A vitamini'nin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.2.	Askorbik asidin moleküler yapısı	10
Şekil 2.3.	Askorbik asidin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları	11
Şekil 2.4.	E vitamini'nin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.5.	Tokoferol'ün pro-oksidan aktivitesi.....	12
Şekil 2.6.	β -Karotenin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.7.	Flavon, flavonol ve flavononun kimyasal yapıları	15
Şekil 2.8.	Kateşin, Epikateşin ve Epigallokateşin'in kimyasal yapıları.....	Error! Bookmark not defined
Şekil 2.9.	Auron ve kalkonların kimyasal yapıları	16
Şekil 2.10.	İsopentenildifosfat (IPP) ve dimetil allildifosfat (DMAPP) yapıları.....	18
Şekil 2.11.	Erkeklerde en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları	19
Şekil 2.12.	Kadınlarda en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları	20
Şekil 2.13.	<i>Alchemilla erzincanensis</i>	22
Şekil 3.1.	DPPH radikalinin bir antioksidan tarafından giderilmesi.....	27
Şekil 3.2.	Troloks'un açık yapısı	28
Şekil 3.3.	Bir antioksidan tarafından ABTS radikalinin giderilmesi	29
Şekil 3.4.	Metal iyonunun EDTA tarafından şelatlanması	30
Şekil 3.5.	Gallik asit'in kimyasal yapısı.....	31
Şekil 3.6.	Gallik aside ait standart eğri	31
Şekil 3.7.	Kuersetinin açık formülü	32
Şekil 3.8.	Kuersetin standart eğrisi	32

Şekil 3.9.	Triaçilgliserollerin esterifikasyonu.....	34
Şekil 3.10.	Hemositometre ile hücre sayımı	37
Şekil 3.11.	XTT tetrazolyum fenazin metosülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazana indirgenmesi	38
Şekil 3.12.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> ekstrelerinin XTT analizinin 96 kuyucuklu plakagösterimi	39
Şekil 4.1.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstrelerinin DPPH radikal giderme aktiviteleri.....	40
Şekil 4.2.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstrelerinin ABTS.+ radikal giderme aktiviteleri.....	41
Şekil 4.3.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün GC-MS kromatogramı	44
Şekil 4.4.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstrelerinin MCF-7 kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri.....	46
Şekil 4.5.	<i>Alchemilla erzincanensis</i> türünün su ve metanol ekstrelerinin MDA- MB-453 kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteler	47

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum bu çalışmanın her aşamasında bilgi, deneyim ve desteğini eksik etmeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet AKTAŞ'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ders döneminde, deneysel çalışmalarında ve tezimin hazırlanmasında bana vermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Abdülkadir ÇOBAN'a, Doç. Dr. Cuma MERTOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNAY'a, Dr. Öğr. Üyesi Nezahat KURT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, Laboratuvar çalışmalarım sırasında vermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı sayın hocam Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, Doç. Dr. Ahmet ALTAY'a araştırmada kullandığım bitkinin teşhisini yapan Prof. Dr. Ali KANDEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında katkılarını esirgemeyen çok değerli arkadaşım Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Öğr. Görevlisi Ertuğrul CEYRAN'a, her zaman desteğini hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra TUNA YILDIRIM'a ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Filiz YANGILAR'a teşekkür ederim.

Beni kimya ile tanıştıran ve sevdiren çok kıymetli hocam Oya EYÜBOĞLU'na, hayatımın her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen özveri ile hep yanımda olan üzerimde çok büyük emeğe sahip olan sevgili anne, babama ve çok değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım...

Ümit Yaşar KAYIŞ

KISALTMALAR

ABTS^{•+}	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) radikali
CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH[•]	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EDTA	: Etilen diamin tetra asetikasit
İPP	: İsoantenildifosfat
NO[•]	: Nitrik oksit radikali
O₂^{•-}	: Süper oksit radikali
OH[•]	: Hidroksi radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
RO[•]	: Alkoksi radikali
ROO[•]	: Peroksit radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
XTT	: Hücre Proliferasyon Kiti

ÖZET

Erzincan Keltatı (*Alchemilla Erzincanensis*) Bitkisinin Yağ Asidi İçeriğinin Belirlenmesi, Antioksidan ve Antiproliferatif Aktivitesinin Araştırılması

Giriş ve Amaç: Bu çalışmada, *Alchemilla erzincanensis* türünün fenolik ve yağ asidi içeriğinin belirlenmesi, antioksidan ve antiproliferatif aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Metod ve Yöntem: Bitkiden elde edilen su, metanol, hekzan, kloroform ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları sırasıyla Folin Ciocalteu ve Alüminyum klorür kolorimetrik metoduyla, fenolik ve yağ asidi içerikleri ise GC-MS analizleriyle belirlendi. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikalini giderme, ABTS katyon radikalini giderme, Fe²⁺ metal iyonlarını şelatlama üzerinden değerlendirildi. Ekstrelerin, meme (MCF-7) ve (MDA-MB 453) kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT testleriyle incelendi.

Bulgular: Bitkinin su ekstresinin fenolik ve flavonoid içerik bakımından metanol ekstresine kıyasla daha zengin olduğu gözlemlendi. GC-MS analizleri sonucunda, bitkinin yapısında bol miktarda hekzanoik asit, metil ester, ikozan, hepta dekanoik asit, 9-oktadekanoik asit, risinoleik asit tespit edildi. Fenolik içeriklerine paralel olarak, bitkinin metanol ekstresinin DPPH radikal giderme, metal şelatlama kapasitelerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Su ekstresinin ise ABTS katyon radikalini daha fazla giderildiği gözlemlendi. GC-MS analizleri ile bitkinin yağ asidi içeriği bakımından zengin olduğu tespit edildi. Sitotoksikite testleri sonucunda, metanol ekstresinin diğer ekstrelerle kıyasla kanser hücre hatlarına karşı daha yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu ve en yüksek aktiviteyi MDA-MB 453 hücrelerine karşı sergilediği görüldü.

Sonuç: Elde edilen veriler ışığında, bu çalışmada kullanılan *Alchemilla erzincanensis* türünün fitoterapide değerlendirilebilecek potansiyelde olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Alchemilla erzincanensis*, antioksidan aktivite, antiproliferatif aktivite, fenolik içerik, GC-MS

ABSTRACT

Determination of Phenolic and Fatty Acid Content of Erzincan Keltati (*Alchemilla Erzincanensis*) Investigation of Antioxidant and Antiproliferative Activity

Introduction and Aim: In this study, it was aimed to determine the phenolic and fatty acid content of *Alchemilla erzincanensis* and to investigate its antioxidant and antiproliferative activities.

Material and Method: Total phenolic and flavonoid substance amounts of water, methanol, hexane and chloroform extracts obtained from the plant were determined by Folin Ciocalteu and Aluminum chloride colorimetric method, respectively, and phenolic and fatty acid contents were determined by GC-MS analysis. The antioxidant activities of the extracts were evaluated through DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, and chelating Fe²⁺ metal ions. The antiproliferative activities of the extracts against breast (MCF-7) and (MDA-MB 453) cancer cell lines were examined by XTT tests.

Results: It was observed that the water extract of the plant was richer in phenolic and flavonoid content compared to the methanol extract. As a result of GC-MS analysis, abundant hexanoic acid, methyl ester, icosan, heptadecanoic acid, 9-octadecanoic acid, ricinoleic acid were detected in the plant structure. Parallel to their phenolic content, it was observed that the DPPH radical removal and metal chelating capacities of the methanol extract of the plant were higher. It was observed that the water extract removed the ABTS cation radical more. It was determined that the plant is rich in fatty acid content by GC-MS analysis. As a result of cytotoxicity tests, it was seen that the methanol extract had higher antiproliferative activity against cancer cell lines compared to other extracts and exhibited the highest activity against MDA-MB 453 cells.

Conclusion: In the light of the data obtained, it was concluded that the *Alchemilla erzincanensis* species used in this study has the potential to be evaluated in phytotherapy.

Keywords: *Alchemilla erzincanensis*, antioxidant activity, antiproliferative activity, GC-MS, phenolic content

1. GİRİŞ

Bitkiler, her çağda insanoğlunun birçok ihtiyacını karşılayan temel canlı grubunu oluşturmuşlardır. İnsanlar, geçmiş çağlarda temel besin ihtiyaçlarını gidermek ve bir kısım sağlık problemlerini giderebilmek amacıyla ilk olarak şifalı bitkileri kullanmışlardır. Çağımızda insanların tekrar doğal hayata yönelmesiyle beraber tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi de giderek artmaktadır (1,2). Bitkisel metabolik ürünler, dünyanın birçok yerinde ilaç yapımında hammadde olarak kullanılmaya devam etmektedir. Kullanılan ilaçların büyük bir kısmını bitkisel ürünler oluşturmaktadır. Hâli hazırda reçete ile satılan ilaçların hemen hemen %25'ini bitki kökenli kimyasallar kaplamaktadır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin büyük bir kısmı sağlık sorunlarını giderebilmek adına şifalı bitkileride kullanmaktadırlar (3).

Bir kısım hastalıkların tedavisi için bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler (flavonoid, alkaloid, terpenoid ve tanin vb) çokca tercih edilmektedir (4). Bu nedenle, tıbbi ve aromatik bitkiler birçok bilim insanının dikkatini çekmiştir (5,6). Türkiye'de yaklaşık 600 şifalı bitki türü bulunduğu rapor edilmiştir (7,8).

Kanser teşhisleri de dahil, birçok hastalığın ve metabolik düzensizliklerin sebeplerinden biri de insan vücudunda oluşan serbest radikallerdir. Serbest radikaller hücre içerisinde farklı hasarlara yol açmaktadırlar. İnsan bedeninde serbest radikallere karşı koruyucu mekanizmalar mevcuttur. Ancak, fazla stres altında bu mekanizmalar fonksiyonlarını yerine getirememekte ve böylece insan bedeni kendisini serbest radikallere karşı koruyamamaktadır. Serbest radikaller hücrelerin DNA'larına saldırmaya başlamasıyla kanser hastalığına ve bunun yanı sıra birçok

rahatsızlığa neden olmaktadırlar. Ortaklanmamış elektronlara sahip atom grupları, kararsız atomlar veya moleküller serbest radikaller olarak açıklanmaktadır (9). Hücrelerde çok önemli işlevlere sahip olan karbohidrat, protein, lipid ve nükleik asit gibi makro moleküllere serbest radikaller tesir ederek çeşitli hasarlara neden olabilmektedirler (10). Diğer taraftan, hücreler serbest radikallerin tahrip edici tesirlerini yok eden veya engel olan antioksidan moleküllere sahiptirler (11,12).

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte, devamlı artan çevre kirliliği ve modern hayat tarzı, başta kanser olmak üzere birden fazla hastalığa yol açmaktadır. Her geçen gün dünyada kanser hastalığına yakalanan ve kanserden ölen insanların sayısı artmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların hem birçok olumsuz yan etkileri vardır hem de maliyeti yüksektir. Bu istenmeyen durumları ortadan kaldırmak ya da en aza indirmek amacıyla tıbbi ve aromatik bitkilerden etkili tedavi aracı olarak kullanılabilecek ve tedavi sürecinde yan tesir göstermeyecek moleküllerin izole edilmesi ve elde edilen bu moleküllerin kemoterapötik ilaç olarak kullanılabilecek bir düzeye getirilmesi mühim bir çalışma sahası olarak öngörülmektedir (13).

Bu tez çalışmasında Erzincan iline endemik olan *Alchemilla erzincanensis* türünden kloroform, hekzan, metanol ve su ile elde edilen ekstraktların yağ asidi ve fenolik içerikleri, antiproliferatif ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

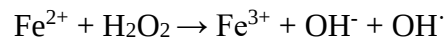
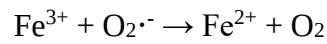
Canlı organizmalarda oksidasyon önemli bir prosestir. Canlıların hayatlarını idame ettirmeleri için oksijen çok önemli bir yere sahiptir. Oksijen eksik indirgenmesi durumunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) meydana gelmesine sebebiyet verir. Antioksidan savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda hücrenin tahribine yol açan reaktif oksijen çeşitleri, hücre ölümüne neden olabilmektedir. Oksijen oksidasyona uğradığında bütün canlı organizmalar için zararlı olmaktadır (14,15).

Dış orbitallerinde bir ya da birden çok eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller serbest radikaller diye adlandırılır (16). Reaktif oksijen türleri (ROS) ya da nitrogen türleri metabolizmada bulunan serbest radikallerin en fazla kaynağıdır. Ekzojen ve endojen kaynaklı reaktif oksijen türleri olabilir. Elektron taşıma sistemi (ETS), oksidasyon reaksiyonlar ve bazı enzimatik reaksiyonlar endojen kaynaklardır. Kanserojen maddeler ve yanlış beslenme, sigara kullanımı, radyasyon ve UV ışınları ise ekzojen kaynaklardır (17). Bazı radikal kaynaklar Tablo 2.1’de gösterildi.

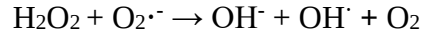
Tablo 2.1. Bazı serbest radikal kaynakları

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Elektron transport zinciri	UV ışınlar, X-rays, Gama ışınları
Enzimler	İlaç oksidasyonları (örnek: parasetamol)
Fagositik hücreler	Sigara
Nötrofiller	Isı şoku
Monositler ve makrofajlar	Okside glutatyon
Eozinofiller	
Endotelyal hücreler	
Otooksidasyon reaksiyonları	

Hidroksil ($\text{OH}^\cdot$), nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), alkoksil ($\text{RO}^\cdot$) ve peroksil ($\text{ROO}^\cdot$) serbest radikal türlerindendir (18,19). Radikal olmayan ancak radikal öncüsü olan hipokloröz (HOCl), hidrojen persoksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) gibi yapılar da bu gruba dahil edilmişlerdir (Tablo 2.2). H_2O_2 geçiş metalleriyle reaksiyona girerek serbest radikallerin meydana gelmesine sebep olmaktadır. Fe (III) varlığında, süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bu elementle tepkimeye girerek Fe (II)'ye indirger. Devamında, hidroksil radikalini ($\text{OH}^\cdot$), Fe (II)'de H_2O_2 ile reaksiyona girerek meydana getirir. Fe (II) de H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini ($\text{OH}^\cdot$) oluşturur (20).



H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile direk olarak da reaksiyona girerek $\text{OH}^\cdot$ radikalini meydana getirebilir (20, 21).



$\text{OH}^{\cdot}$ radikalinin olumsuz etkisi sonucunda hücrelerde lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonuna maruz kalan hücrenin membran yapısı, membran geçirgenliği ve bileşenleri hasar görür. Bu durum ise hücre ölümlerine yol açabilir (19). Diğer taraftan, hidrojen peroksiti (H_2O_2) hücrelerden uzaklaştırma görevini ise peroksidaz ve katalaz gibi enzimatik antioksidanlar üstlenmişlerdir (22).

Tablo 2.2.Reaktif oksijen çeşitleri ve serbest olmayan radikaller

Reaktif oksijen çeşitleri (radikal yapılar)		Serbest olmayan radikal çeşitleri (radikal oluşturan yapılar)	
Süperoksit radikali	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikali	$\text{HO}^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$
Hidroperoksil radikali	$\text{HOO}^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid radikali	$\text{L}^{\cdot}$	Lipid hidroperoksit	LOOH
Lipid peroksil radikali	$\text{LOO}^{\cdot}$	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksil radikali	$\text{ROO}^{\cdot}$	Peroksi nitrit	$\text{ONOO}^{\cdot}$
Lipid alkoksil radikali	$\text{LO}^{\cdot}$	Diazot trioksit	N_2O_3
Azot dioksit radikali	$\text{NO}_2^{\cdot}$	Nitrik asit	HNO_3
Nitrik oksit radikali	$\text{NO}^{\cdot}$	Nitril klorür	NO_2Cl
Nitroksil katyon	NO^+	Nitroksil anyon	NO^-
Thiyl radikal	$\text{RS}^{\cdot}$	Peroxy nitröz asit	ONOOH
Protein radikal	$\text{P}^{\cdot}$	Nitrik oksit	N_2O

2.2. Antioksidanlar

Serbest radikallerin olumsuz etkilerini engellemek için canlı organizmalarda antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Antioksidanlar ve serbest oksijen radikaller (SOR) canlı dokularda devamlı kontrollü bir şekilde üretilirler.

Antioksidanlar vücutta oksidan/antioksidan dengesini sağlamak ve serbest radikalleri etkisizleştirmek suretiyle vücudu korurlar. Fazla üretilen SOR'lar, doku bütünlüğünün ve fonksiyonlarının normal düzeylerde sürdürülmesi için, antioksidanlar tarafından nötralize edilirler. Antioksidanlar radikal üretimini engelleyerek ve oluşan radikalleri etkisizleştirerek görev yaparlar (23). Antioksidanlar başlıca dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler (24).

1. Süpürme etkisi (Scavenging effect): Daha zayıf yeni bir molekül haline getirerek oksidanları etkisiz duruma getirir. Mikromoleküller ve antioksidan enzimler böyle etki ederler.
2. Söndürme etkisi (Quenching effect): Oksidanlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif etmesine denir. Flavonoidler, vitaminler, mannitol ve timetazidin böyle etki gösterirler.
3. Zincir kırma etkisi (Chain breaking effect): Reaktif Oksijen Türlerini bağlayıp zincirleri kırarak fonksiyonları engelleyici etki gösterir. Ağır mineraller, serüloplazmin ve hemoglobin bu etkiyi gösterir.
4. Onarma etkisi (Repair effect): Serbest radikaller tarafından oluşturulan hasarın onarımını sağlarlar.

İnsan vücudunda sentezlenip sentezlenmediklerine göre antioksidanlar iki guruba ayrılır (25).

1. Endojen (vücutta sentezlenebilen) antioksidanlar.
2. Eksojen (vücutta sentezlenemeyen) antioksidanlar.

Tablo 2.3'de antioksidanların sınıflandırılması verilmiştir.

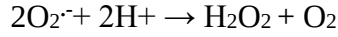
Tablo 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -Lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR		
Vitaminler	İlaç Olarak Kullanılanlar	
β -Karoten (Vitamin A)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
α -Tokoferol (Vitamin E)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)	Nötrofil adezyon inhibitörleri
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	Sitokinler (TNF ve IL-1)
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	Barbitüratlar
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	Demir şelatörleri
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	

2.2.1. Enzimatik antioksidanlar

2.2.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

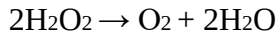
Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünü sağlayan reaksiyonları katalizleyen bir enzimdir (26).



Süper oksit dismutaz ailesindeki tüm üyeler aktif bölgelerinde metal iyonuna sahiptirler. Bu enzimdeki veya aktive edildiği mekanizmadaki genetik defektler, solunum patlaması kaybına ve dolayısıyla kronik granümatöz hastalığın özelliği olan enfeksiyona yatkınlığın artmasına sebep olur (27).

2.2.1.2. Katalaz (CAT)

H_2O_2 'nin yıkımını katalizleyen enzimlere katalaz adı verilir. Katalaz, H_2O_2 moleküllerinden $OH^{\cdot}$ radikallerinin meydana gelmesine engel olmaktadır (28). H_2O_2 molekülü katalaz enziminin varlığında parçalanarak oksijen ve suya dönüşür.



Katalaz enziminin peroksidatif aktivitesi de vardır. Bu etkisini formik asit, formaldehid, alkoller ve fenoller gibi bileşiklerde gösterir. Elektron donör görevini bu reaksiyonda düşük molekül ağırlıklı alkoller sergiler (29).

2.2.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

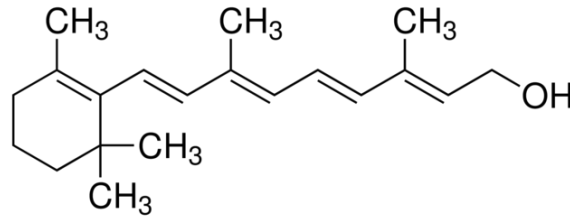
Glutasyon peroksidaz, peroksit moleküllerini (hidroperoksitler, hidrojen peroksit ve peroksit) alkollere indirger ve bunlardan hidroksil radikallerinin meydana gelmesine engel olur (30). Glutasyon peroksidaz ayrıca, hidroperoksitler ile hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü de engellemektedir. GPx 4 alt birimden oluşur. Bu alt birimlerin her biri selenosistein içerir. Redükte glutasyonu

yükseltgerken H_2O_2 'yi de suya dönüştürür. Bu şekilde membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan stres karşısında korumuş olur (31). Ayrıca selenyum bu enzimin bir integral parçası olduğu için selenyum eksikliği GPx eksikliğine neden olabilir (32).

2.2.2. Non-enzimatik antioksidanlar

2.2.2.1. Vitamin A (β -karoten)

A vitamini organik çözücülerde ve yağda çözünebilen ancak suda oldukça az çözünebilen vitamindir. İhtiyaçtan fazlası karaciğerde depolanır. Molekül yapısında çift bağlar vardır (Şekil 2.1). Çift bağlar havadaki oksijen tarafından kolayca oksitlenebilirler ve buna bağlı olarak aktivitelerinde düşüş görülür. Üreme, görme, epitel dokunun sağlamlığı ve büyüme gibi birçok önemli fonksiyonun gerçekleşebilmesi için A vitamini büyük öneme sahiptir. Bu bileşiklere retinoidler de denir. Retinoik asit retinal, β -karoten (β -C) ve retinol bu gruba aittirler.

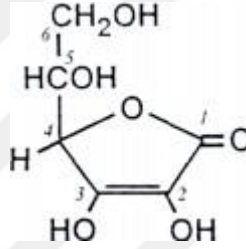


Şekil 2.1. A vitamininin kimyasal yapısı

Retinoidler ile Provitamin A, vitamin A'nın prekürsörüdürler. Bu bileşikler oldukça önemli biyoantioksidanlardır. Polien zincir atomları α -karbonundan proton ayırarak ya da polien zincir atomlarına bağlanarak bu bileşikler serbest radikallerin giderilmelerini sağlarlar (33). Ayrıca, retinoidler ile provitamin A polien zincirinde singlet oksijen (1O_2) gibi uyarılmış molekülleri etkisiz hale getirip antioksidan aktiviteleri de gösterirler (34).

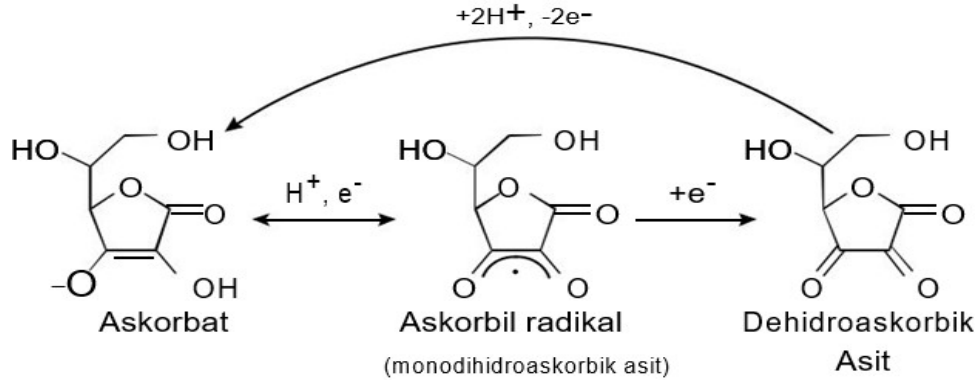
2.2.2.2. Vitamin C (Askorbik asit)

Askorbik asit bir şeker asidinin lakton şeklidir (Şekil 2.2). C vitamini dibazik bir asittir ve insanlar için önemli bir antioksidan etkiye sahiptir. Güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit hafif şartlar altında dehidroksi askorbik aside oksitlenir (Şekil 2.3) (35). Vitamin C lipidler, proteinler ve DNA gibi makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olan reaktif oksijen çeşitlerinin negatif etkilerini azaltıcı özelliğede sahiptir. Böylece felç, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik rahatsızlıkların oluşmalarıda azalır (36).



Şekil 2.2. Askorbik asidin moleküler yapısı

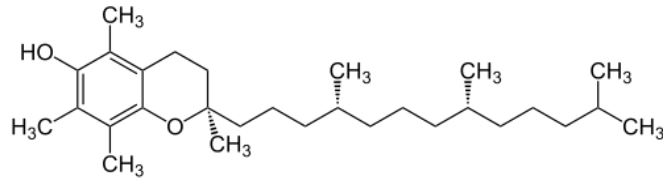
Bir molekülün indirgeme aktivitesi o molekülün antioksidan etkisinin bir göstergesidir. İndirgenme etkileri yüksek olan oksidasyona uğramış olan moleküller ise askorbik asit sayesinde çok kolay indirgenebilir. Bundan dolayı askorbik asitte kuvvetli bir antioksidan aktivite göstermektedir (36). Antioksidan bileşiklerden bazıları ise serbest radikalleri süpürebilecek ya da nötralize edebilecek hidrojen atomlarına sahiptirler. Askorbik asit, Şekil 2.3’de görüldüğü gibi H atomunu serbest radikallere aktararak onları nötralize eder ve kendisi ise askorbat radikali formuna dönüşür. Askorbat radikalinin rezonans yapısı askorbik asidi fazla kararlı kıldığından dolayı serbest radikallere oranla dahada az reaktif özellik göstermektedir (35,37).



Şekil 2.3. Askorbik asidin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları.

2.2.2.3. Vitamin E (Tokoferoller)

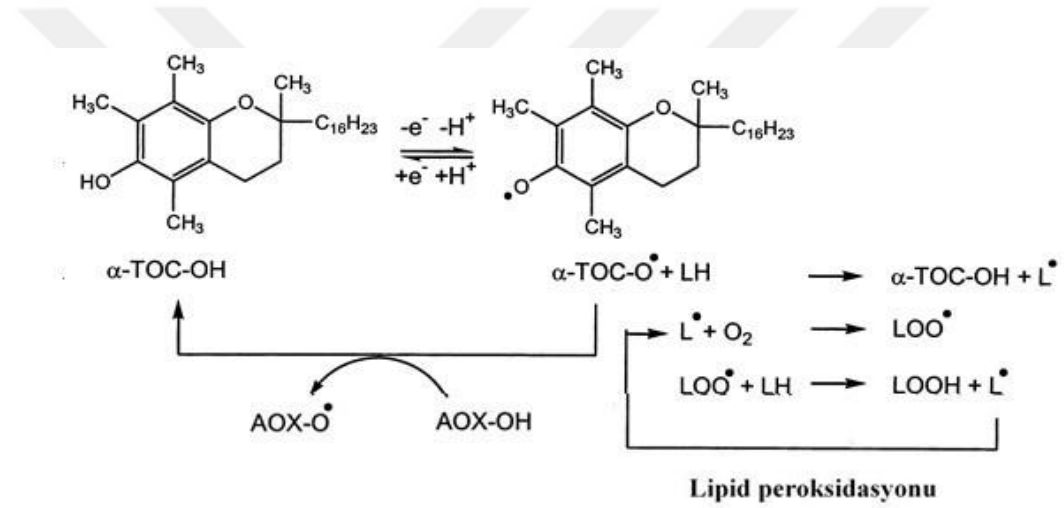
Vitamin E suda çözünmeyen ancak yağ ve organik çözücülerde çözünebilen oldukça güçlü doğal bir antioksidandır (Şekil 2.4). Metabolizmada birden çok fonksiyonu vardır. Serbest radikalleri nötralize etme, hücre duvarını koruma, hücre membranlarının zarar görmesini önleme gibi etkiler bunlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca bazı kanser çeşitlerinin ilerlemelerini engelleme, katarakt, kalp hastalıkları ve alyuvarları koruma gibi etkileri de vardır.



Şekil 2.4. E vitamininin kimyasal yapısı

Endojen savunmayı onarma ve serbest radikal süpürme mekanizması nedeniyle E vitamininin etkili, geniş ve kuvvetli bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu da belirtilmiştir (38). Tokoferoller antioksidan olarak bilinseler de her şartta koruyucu özellikleri yoktur (39). Lipid peroksidasyonunu başlatabilen α -tokoferol radikalleri oksidatif stres şartlarında artan oranda vitamin E (α -tokoferol)

mevcudiyetinde meydana gelir. Organizmada antioksidan seviyesi dengeli olduğu durumda diğer antioksidanların etkisiyle α - tokoferol radikalleri tekrar α - tokoferole indirgendikleri için prooksidan aktivitesi durdurulur (40). Fakat oksitadif stres şartlarının artmasında artan miktarda α - tokoferol ile ortaya çıkan α - tokoferol radikalleri daha çok meydana gelir ve organizmadaki başka antioksidanlar oluşan bu radikalleri durdurmakta yetersiz kalır. Ayrıca vitamin E güneş kremleri ve cilt kozmetiklerinde fazlaca bulunduğu için dikkatle kullanılmalıdır. Çok fazla kullanılması durumunda cilt kanserlerine neden olduğu belirtilmiştir (41).

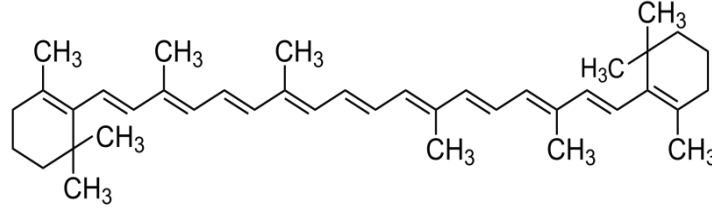


Şekil 2.5. Tokoferol'ün pro-oksidan aktivitesi.

2.2.2.4. Karotenler

Karotenoidler yüksek bitkilerin kloroplastlarında bulunurlar ve çoğunlukla klorofille maskelenirler. Kloroplastlar bitkilerin yaşlanması ile parçalanırlar ve portakal-sarı renkte karotenoidler meydana gelir. Karotenoidler plastidlerde yarı-kristal şeklinde bulunurlar ve tetraterpen ismiyle de sınıflandırılırlar. Ayrıca tüm terpenlerde 5. karbon atomuna bağlanan izopentandan meydana gelirler (42).

Karotenoidlerin yapılarında konjuge çift bağlar vardır (Şekil 2.6) ve bundan dolayı singlet oksijeni bastırarak serbest radikalleri süpürürler ve hidrojen peroksidin oluşmasını azaltarak kuvvetli bir antioksidan aktivite gösterirler (43,44).



Şekil 2.6.β-Karotenin kimyasal yapısı

Düşük oksijen basıncında (<150 torr) karotenoidlerin antioksidan özellik göstermiş olduğu fakat yüksek oksijen konsantrasyonunda ise bu özelliğini kaybetmiş olduğu ya da prooksidan olduğu belirtilmiştir. Ayrıca β-karotenin yüksek oksijen basıncında prooksidan etki gösterdiğide bilinmekte (45). Karotenoidlerin hem *in vivo* ve hem de *in vitro* ortamda düşük kısmi lipid peroksidasyonunu da önlediği gibi oksijen basıncında tekli oksijene karşı koruyuculuğu da belirtilmektedir (46). Aynı şekilde antioksidan aktivitesini karotenoid konsantrasyonu da etkilemektedir. Karotenoidlerin yüksek konsantrasyonda antioksidan kapasitesinin azaldığı ya da prooksidan etki gösterdiği söylenmektedir. Sıçanlara yüksek oranda β-karoten verildiği zaman akciğerlerinde kansere sebebiyet veren sitokrom P 450 enzimlerinde artma olduğu bildirilmiştir. β-karotenle uyarılmış olan sitokrom P 450 enzimlerinin kapasitesiyle süperoksit radikal oluşumu arasında ciddi bağlantı olduğu belirlenmiştir (47).

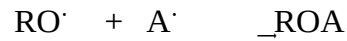
2.2.2.5. Fenolik bileşikler

En az bir aromatik halkayı yapılarında bulunduran ve bu aromatik halkaya bağlı bir ya da birden çok hidroksil grubuna sahip bileşikler fenolik bileşiklerdir. Yapısal olarak fazla farklılıkların olması nedeniyle fenolik bileşiklerin pek çok çeşidi

bitkiler üzerinde tanımlanmış olup birinci derecede önem taşımayan sekonder metabolitlerdir (48). Fenolik bileşikler flavonoidler ve fenolik asitler diye iki ayrı gruba ayrılırlar. Hidroksisinamik asit ve hidroksibenzoik asit olmak üzere fenolik asitlerde ikiye ayrılmıştır. Hidroksibenzoik asit grubuna salisilik asit, vanilik asit, gallik asit bileşikleri örnek olarak verilebilir. Hidroksisinamik asitlere, ferulik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit ve kafeik asit örnek teşkil eder (49).

Fenolik bileşikler antioksidan özelliklerini metal şelatlama ve serbest radikalleri sonlandırıcı etkileriyle gösterir (50). Bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler antioksidan olarak tanınmakta ve ticari anlamda üretimleri yapılmaktadır. Ayrıca öncelikle flavonoidler olmak üzere, kumarinler ve sinamik asit türevleri bitkilerin antioksidan aktivitelerinin başlıca kaynaklarıdır.

Yapılarında var olan OH grupları sayesinde fenolik bileşikler oksidanlara H^+ atomu aktararak antioksidan özelliklerini gösterirler. Lipid radikallerine H^+ veren fenolik antioksidanlar lipid oksidasyonu ile etkileşim gösterirler. Ayrı olarak, alkoksil ($RO\cdot$) ve peroksil ($ROO\cdot$) radikallerini de parçalayıp lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunun sona ermesini sağlarlar (51).

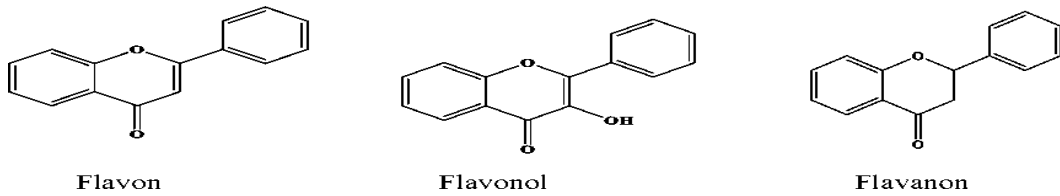


Sonuç olarak meydana gelen fenoksil radikali de yeni radikal oluşmasına neden olmamalı ya da zincir reaksiyonu ile oksidasyona uğramamalıdır. Bu nedenle,

fenolik antioksidanlar çok iyi bir H^+ ve e^- sağlayıcısıdır. Çiftlenmemiş elektronların stabilitelerini fenoksil radikali yapısında mevcut olan aromatik halka etrafında lokalizasyon ile dengeler. Yapısında ki OH grubu sayısı ile fenolik asitler ve esterlerinin antioksidan kapasiteleri artmaktadır (52). Fenolik bileşikler antioksidan aktivitelerini orto veya para pozisyonundaki OH^- grupları ile artırmaktadırlar.

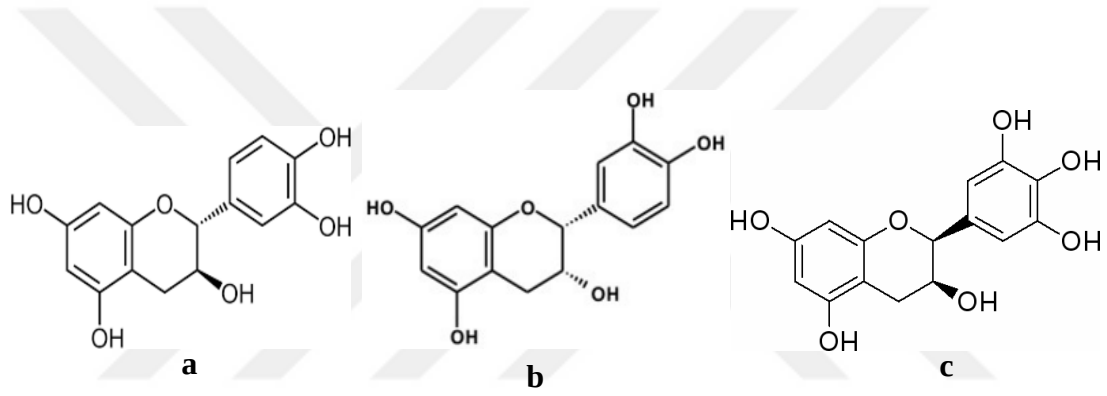
2.2.2.6. Flavonoidler

Flavonoidler iki benzen halkası ve bu halkaları birbiriyle bağlayan piron ya da piron halkasından oluşan $C_6-C_3-C_6$ (C_{15}) yapısına sahiptir (53). Çıkış maddeleri fenol olan, güneş ışığı yardımıyla bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde fotomorfojenez reaksiyonları ile oluşan organik bileşiklerdir (54). Besinlerde yaygın olarak bulunurlar ve onların spesifik renklere sahip olmalarını sağlarlar (55). Flavonoidler flavonlar ve izoflavonlar, proantosiyandinler ve antosiyandinler, flavonollar, kateşinler, flavanonlar, kalkonlar ve auronlar adı verilen gruplara ayrılmışlardır (56). Flavanon ve flavonolün genel formülleri Şekil 2.7'deki gibidir. Doğal renk maddeleri antosiyandinlerdir. Meyvelere, meyve sularına ve sebzelere renklerini verirler (57). Flavonlara apigenin ve luteolin örnek olarak verilebilirler.

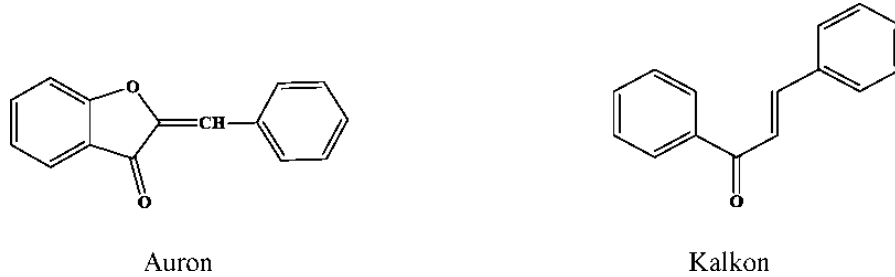


Şekil 2.7. Flavon, flavonol ve flavanonun kimyasal yapıları.

Flavonollare örnek olarak kaemferol, mirisetin, kuersetin, isoramnetin verilebilirler. Flavanonları flavonlardan ayıran özellikleri flavanonların yapılarında ortada bulunan halkada çift bağ içermemeleridir (Şekil 2.8). Bunlara örnek olarak hesperidin, aringin, naringenin, floridzin ve floretin verilebilir (58). Flavonların indirgenmiş türevleri olan flavonollerin en önemlileri kateşin, epikateşin, epigallokateşindir (Şekil 2.8). Gıdalarda bol bulunan ve flavon-3-ol yapısına sahip flavonoid grubunu kateşinler oluşturur (59). Flavonoidlerin önemli bir bölümünü ise auronlar ve kalkonlar oluşturur (Şekil 2.9).



Şekil 2.8. Kateşin (a), Epikateşin (b) ve Epigallokateşinin (c) kimyasal yapıları



Şekil 2.9. Auron ve kalkonların kimyasal yapıları.

2.3. Esansiyel Yağlar

Uçucu yağlar olarak da bilinen esansiyel yağlar bitkilerin yaprak, meyve, kök, tohum ve çiçeklerinde bulunan sekonder metabolitlerdir. Bitki kısımlarından çözücü ekstraksiyonu, hidrodistilasyon, soğuk sıkma ya da sıvılaştırılmış gaz gibi farklı

ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilirler (60,61). Bunlar lipofilik maddeler olduğu için hücre zarından kolay diffüze olurlar. Sentezlendikleri bölgelerden bitkinin diğer organlarına taşınırlar. Bu bileşikler bitkilerde savunma aracı olarak kullanılır ve afid gibi parazit canlıları direkt etkileyerek bitkileri koruyabilir. Bir kısmı aromatik olan bu bileşikler bir taraftan cezbedici özellikleriyle hayvanları etkilemekte, diğer taraftan yakınında olan bitkilerin köklerine yakın yaşayan mantarlara ve bakterilere karşı tehdit oluşturmak sureti ile bitkiyi savunur (60).

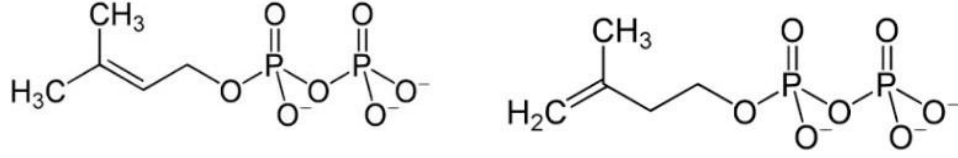
Esansiyel yağlarda bulunan kimyasal bileşiklerin başında terpenler gelir. Bunun yanı sıra bazen fenilpropanoidler ve diğer bileşenler de sürekli olmasa da bulunur. Bu bileşikler hidrokarbonların oksijen, azot ve kükürtlü türevlerdir. Bu bileşikler genellikle düşük kütleli olan moleküllerdir ve sudaki çözünürlükleri ise sınırlıdır (62, 63).

2.3.1. Terpen Türevleri

Terpen grubu doğal bileşikler içerisinde geniş bir yere sahiptir. 30.000'den fazla terpen yapısı bilinmektedirler (64, 65). Terpen ismi ilk üyelerin izole edildiği ve monoterpenlerce zengin olan çam reçinesinden elde edilen turpentine'den gelmektedir (64).

Terpenler bitkilerde iki farklı yolla sentezlenir: 1) Mevalonik asit yolu; bu yolla çoğunlukla sitoplazma, mitokondri ve endoplazmik retikulumda ubiquinonlar, seskiterpenler ve steroller fazlaca üretilir. 2) Metil-eritritol fosfat yolu; metabolik olmayan asit diye bilinen bu yolla çok yönlü hücrelerde klorofil fitoller ve karotenoidler gibi esansiyel yağlarda da bulunmayan maddeler ve karbondioksitin sentezi sağlanır. Bu iki yolda terpenlerin temel yapı taşı olan dimetil allildifosfat

(DMAPP) ve isopentenildifosfat (IPP) izomerleri (Şekil 2.10) üretilir (65, 66, 67, 68).



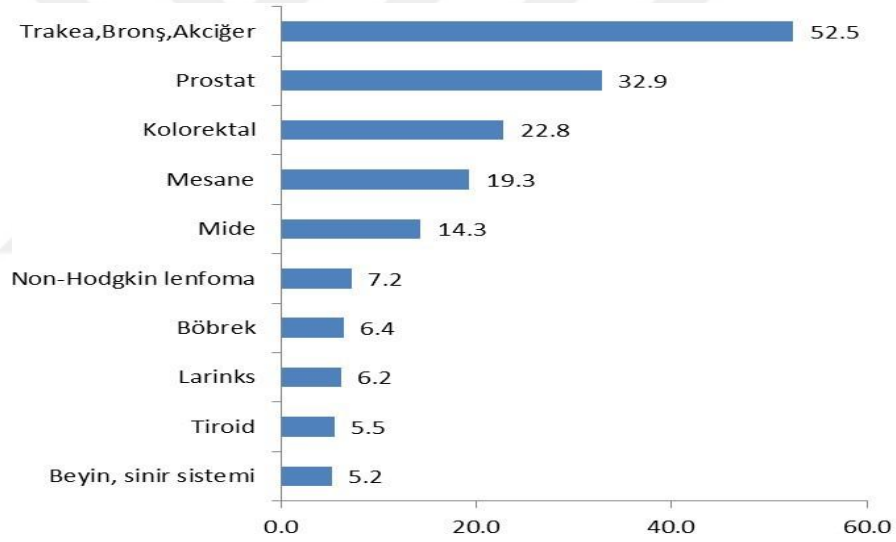
Şekil 2.10. İsoipentenildifosfat (IPP) ve dimetil allildifosfat (DMAPP) yapıları.

2.4. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrol edilemeden çoğalmaları olarak tanımlanmıştır. Kanser hücrelerinde en belirgin özellikler; kontrolsüz çoğalabilmeleri, bağımsız halde yaşayabilme kabiliyetleri, lenf ve kan dolaşımı vasıtası ile vücuttaki sağlam organ ve dokulara taşınarak metastaz yapmak suretiyle sağlam olan dokularda fonksiyon bozukluklarına yol açmalarıdır. Tüm bu olayların bir araya gelmesi ise kanserleri tehlikeli kılar. Kanserli hücre yapılarında çok fazla değişiklik meydana gelir. Ayrıca hücrede düzenli olarak yapılan görevlerde değişim olduğu görülür. Hücreler sağlıklı iken yaptıkları görevleri kanserli hallerinde yapamazlar veya bir takım başka görevler edinir. Çoğalıp yayılan ve başka organlara taşınan hücrelerde, fizyolojik dokunmayla çoğalma özelliğinin baskılanma mekanizmalarını kaybeder ve hücrelerden gelen sinyallerde cevap vermeyerek apoptoza (programlı hücre ölümü) da girmez (69).

Kanser oluşumunda değiştirilemeyen ve değiştirilebilen risk faktörleri önemli bir yere sahiptirler. Yaş, aile öyküsü ve cinsiyet değiştirilemeyen faktörlere örnek verilebilirler. Radyasyon, alkol ve sigara tüketimi, kötü beslenme, UV ışınları, virüsler, gıda katkı maddeleri, bazı kimyasal maddeler, hava kirliliği bazı değiştirilebilen faktörlerdendir (hsqm.saglık.gov.tr). Erkek ve kadınlarda kanser

tiplerinin görülme sıklığı farklılık göstermekle beraber, ırklara ve coğrafi bölgelere göre de bu sıklıkta farklılıklar görülmektedir. Kadın ve erkeklerde en çok cilt kanseri görülmektedir. Türkiye'de erkeklerde sırasıyla; “akciğer, prostat, kalın bağırsak, rektum, mide ve pankreas kanserleri” sık görülürken, “kadınlarda meme, akciğer, kalın bağırsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri” daha çok görülmektedir (Şekil 2.11 ve 2.12). Son senelerde, yaşlı nüfusun artması ve sigara içen kişilerin sayılarının artmasıyla birlikte kanser vakalarında da ciddi bir artış görülmektedir. Hatta akciğer kanserinin görülme sıklığı kadınlarda ki sigara kullanımının artmasıyla meme kanserine yaklaşmıştır (hsgm.saglık.gov.tr).



Şekil 2.11. Erkeklerde en sık görülen kanserlerin yaşıya göre standardize edilmiş hızları (hsgm.saglık.gov.tr).



Şekil 2.12. Kadınlarda en sık görülen kanserlerin yaşıya göre standardize edilmiş hızları (hsgm.saglik.gov.tr).

2.5. *Alchemilla erzincanensis*

Alchemilla erzincanensis Rosaceae familyasından *Alchemilla L.* cinsine ait bir bitki türüdür. *Alchemilla* Avrupa, Asya, Doğu Afrika, Kuzey Amerika ve Avustralya’da yayılış gösterir. Bu bitkinin peyzaj amaçlı kültürü de yapılmaktadır. *Alchemilla* cinsinin Dünyada 1000’den fazla türü vardır (70). Ülkemiz genelinde ise 82 tür ile geniş bir yayılış alanına sahiptir (71).

Alchemilla türleri dünyada tıbbi amaçlı olarak yaygın kullanılsa da ülkemizde halk arasında fazla tanınmamaktadır. Anadolu’da halk arasında “Yıldız nişanı” veya “Fındık otu” olarak bilinen *A. pseudocartalinica* Juz. ve “Aslan ayağı” olarak bilinen *A. arvensis* (L.) Scop. türlerinin kök ve yaprakları kabız etkili, idrar söktürücü ve kuvvet verici olarak kullanılmaktadır (71).

Alchemilla, arapça Alkemelych (alchemy= simya) kelimesinden türetilmiştir. Bitkinin halk arasına bazı güçlere sahip olduğuna inanılmaktadır. Bu sebeple bitki bu

isimi almıştır. Bütün hastalıkları iyileştirme, değersiz maddeleri altın değerine çevirme ve hayatı sonsuz biçimde uzatacak ölümsüzlük iksirini bulma çabalarına simya denilmesiyle bağlantılı olarak Latin yazarlar bitkinin çiğ tanelerini bir kimyacı gibi kullanıp saflaştırdıklarına inanmışlar ve hastalıkların tedavisinde güçlü etkilere sahip olduğunu düşünmüşlerdir (72).

Alchemilla cinsine ait türler flavonoid ve tanen yapısındaki fenolik bileşiklerce zengindir. Ayrıca triterpenik maddeler taşıdığı belirtilmiştir. *Alchemilla* türlerinin sahip olduğu zengin flavonoid ve tanen içeriği bitkinin yüksek oranda antioksidan aktivite göstermesini sağlamaktadır. Yaraların iyileşmesi için ve kapanmasında hücre çoğalmasının büyük etkisi olduğu bilinmektedir. Mukoza membranı ve deri üzerindeki yaranın iyileşme hızını geciktirmek için çoğalan bakteri hücreleri ile yaranın kapanması için çoğalan fibroblast ve epitelium hücreleri arasında sürekli bir yarışma söz konusudur (73). *Alchemilla* türlerinin tanen muhteiyatının zengin olmasından dolayı halk arasında yüzyıllardır yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (74).

Alchemilla türleri Türkiye’de Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Orta Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir. Halk arasında ‘Erzincan keltatı’ olarak bilinen *Alchemilla erzincanensis*, Erzincan’a özgü endemik bir tür olup çalimsı yapıdadır (Şekil 2.13). Erzincan ovasının 2100 metre seviyelerinin üzerinde yüksek dağ kesimlerinde higrofil vejetasyonun bir üyesi olarak topluluk şeklinde dağılım gösterir (75).



Şekil 2.13. *Alchemilla erzincanensis*

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz adı	Cihaz Markası
Hassas terazi	Shimadzu, ATX224
Manyetik karıştırıcı	MR Hei-Standart
Kompresör	Rocker 300 Modd
Evaporatör	Heidolp
GC-MS	Thermo Scientific
Santrifüj	Isolab 5810 R
CO ₂ inkübatör	Nüve, EC160
Ters faz kontrast mikroskopu	Nikon Eclips Tİ-U
pH ölçer	Mettler Toledo, ABD
Spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda 35
-80°C dondurucu	Haier, DW-86L628
-20°C dondurucu	Haier, DW-40L508
Mikropleyt okuyucusu	Epoch, BioTek
Su banyosu	Nüve, ST30-22
Ultrasonik banyo	Isolab
Biyogüvenlik kabini	Bilser BLF 200

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Antioksidan aktivite ve fenolik içerik tayininde kullanılan kimyasallar:

Kimyasal adı	Kimyasalın markası
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich-Germany,
AlCl ₃	Sigma-Aldrich-Germany
NaNO ₂	Sigma-Aldrich-Germany
Gallik asit	Sigma-Aldrich-Germany
Trolox	Sigma-Aldrich-Germany
DPPH·	Sigma-Aldrich-Germany
ABTS·	Sigma-Aldrich-Germany
Etanol	Sigma-Aldrich-Germany
EDTA	Sigma-Aldrich-Germany
K ₂ S ₂ O ₈	Merck-Germany
Folin Ciocalteu reaktifi	Merck-Germany
NaOH	Merck-Germany
EDTA	Fluka, Switzerland
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich-Germany
Ferrozin	Sigma-Aldrich-Germany
FeCl ₂	Sigma-Aldrich-Germany
CH ₃ COONH ₄	Merck-Germany
α - tokoferol	Merck-Germany
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich-Germany
Tripan mavi boyası	Biological Industries, Israel
XTT kiti	Biological Industries, Israel

Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan besiyerleri ve hücre hatları; insan meme kanser hücre hattı (MCF-7) ve MDA-MB 453 ATCC (American Type Culture Collection, LGC Promochem, UK) firmasından ticari olarak temin edildi. Büyüme ortamı olarak Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ve McCoy's 5A

besiyerleri kullanıldı. Bu besiyerlerine %1 L-Glutamin (Lonza, Belgium), %10 fetal bovine serum (Lonza, Belgium) ve %1 penicillin–streptomycin (Pen Strep) takviye yapılmıştır. Yıkama ortamı olarak PBS (Lonza, Belgium) kullanıldı. Ekstraksiyon için çözücü olarak hekzan, kloroform, metanol ve su kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.1.3.1. Toplam fenolik miktar tayini

- Kütlece %2’lik Na_2CO_3 çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 tartılıp alınarak 100 mL’lik balon jojede bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.
- Folin-Ciocalteu Reaktifi: %20’lik Folin-Ciocalteu reaktifi hazır olarak kullanıldı.

3.1.3.2. Toplam flavonoid miktar tayini

- Kütlece %5’lik NaNO_2 çözeltisi: 5 g NaNO_2 tartılıp alınarak bir miktar distile su ile çözdürüldü ve hacmi 100 mL’ye distile su ile tamamlandı.
- Kütlece %10’luk AlCl_3 çözeltisi: 10 g AlCl_3 tartılıp alınarak bir miktar distile su ile çözdürüldü ve hacmi 100 mL’ye distile su ile tamamlandı.
- 1 M NaOH çözeltisi: 4 g NaOH tartılıp alınarak bir miktar distile suda çözdürüldü ve hacmi 100 mL’ye distile su ile tamamlandı.

3.1.3.3. DPPH’ radikal giderme aktivitesi

- DPPH’ Radikali (0.1mM): 5 mg DPPH’ radikali tartılıp alındı, 100 mL etanol içinde çözdürüldü.

3.1.3.4. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi

- 20 mL 7 mM ABTS çözeltisi: 76,8 mg ABTS distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 20 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- 20 mL 2,45 mM K₂S₂O₈ çözeltisi: 13,25 mg K₂S₂O₈ distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 20 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- ABTS[•] serbest radikal çözeltisi: 20 mL 7 mM ABTS ve 20 mL 2,45 mM K₂S₂O₈ 1:1 oranında karıştırıldı ve 734 nm'de yaklaşık 0,70 birim absorbans verinceye kadar (yaklaşık 1/120 oranında) metanol ile seyreltilti.

3.1.3.5. Metal şelatlama kapasite tayini

- 50 mL 2 mM FeCl₂·4H₂O çözeltisinin hazırlanması: 19,8 mg FeCl₂·4H₂O tartılarak alındı distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- 50 mL 5 mM Ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 123 mg Ferrozin distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı.

3.2. Metod

3.2.1. *Alchemilla erzincanensis* bitkisinin toplanılması, kurutulması ve ekstraksiyonu

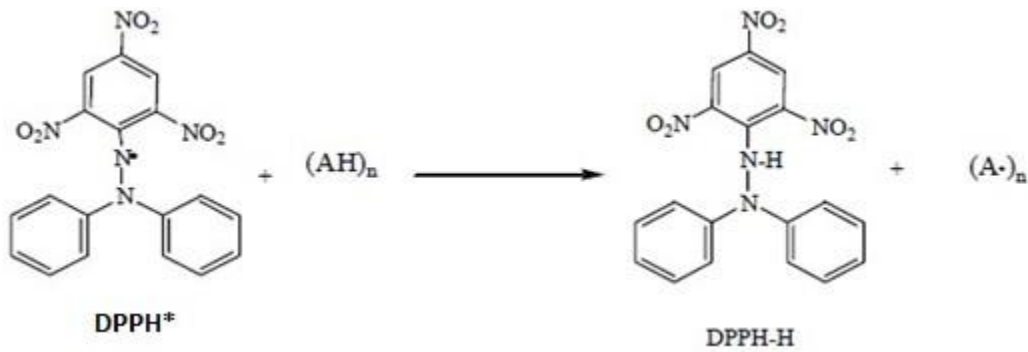
Yaptığımız bu çalışmada kullanılan *Alchemilla erzincanensis* türü Erzincan yöresi, Pöske Dağı 1412 m rakımlı Ahmediye Köyü kırsalından toplandı. Türün teşhisi taksonomik olarak Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından yapıldı. Örnekler oda sıcaklığında güneş ışığıyla temassız bir ortamda kurutulduktan sonra gövde kısmıyla birlikte havan içerisinde konuldu ve sıvı azot yardımıyla havanda dövülerek toz haline getirildi. Bitkinin dört farklı ekstresi hazırlandı. Bunun için; elde edilen bitki tozu dört ayrı balon jöjelere koyuldu ve herbirinin üzerine miktarlarının dört katı kadar

sırası ile hekzan, kloroform, su ve metanol ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırıldı. Oluşan ekstraktlar Whatman kağıdıyla süzüldü ve çözücülerini evaporatör vasıtasıyla uzaklaştırıldılar. -80°C’de dondurulan numuneler ardından 48 saat liyofilize edildiler. Deneysel çalışmalarımızda kullanacağımız numuneler -20°C’de koyu renkli cam şişelerde muhafaza edildi.

3.2.2. Antioksidan aktivite tayin metotları

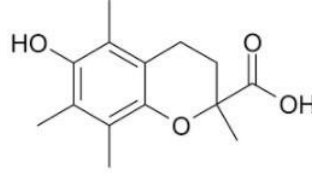
3.2.2.1. DPPH[•] radikalini giderme aktivitesi tayini

Antioksidan varlığında kararlı serbest radikal olan DPPH[•]’ın süpürülmesiyle karakteristik mor renk daha açık renge dönüşmektedir. Açık mor ise spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir (76). DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi bitki ekstraktları ya da diğer antioksidan kaynaklar tarafından ne kadar açık hale dönüştürülürse, antioksidan kaynağın serbest radikali giderme gücü de o kadar çok demektir (77). DPPH[•] radikali’nin antioksidan kaynağın etkisiyle söndürülme reaksiyonu Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. DPPH radikalinin bir antioksidan tarafından giderilme reaksiyonu.

Alchemilla erzincanensis türünün su ve metanol ekstraktlarının DPPH[•] serbest radikali giderme aktivitelerinin tespit edilebilmesi için standart antioksidan olarak troloks kullanıldı (Şekil 3.2).

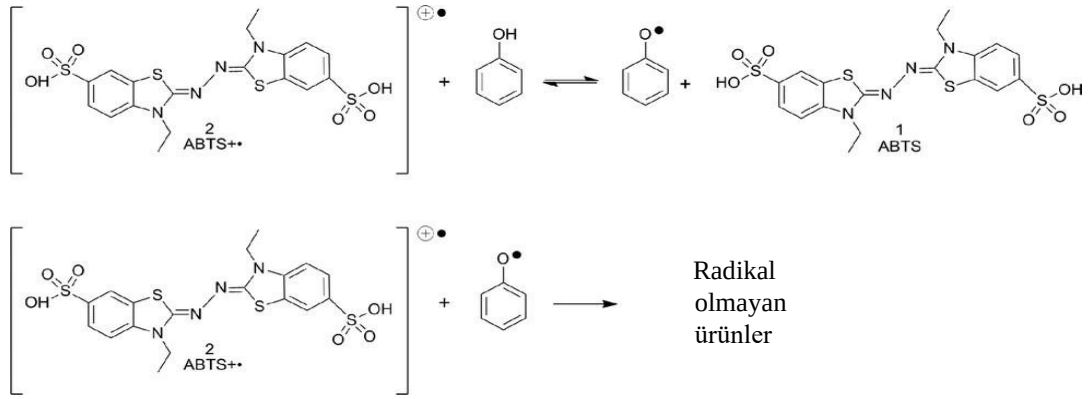


Şekil 3.2. Troloks'un açık yapısı

Bitki ekstralarının DPPH[•] radikalini giderme aktivitesi tayini Blois (1958) metodu ile gerçekleştirildi (78). 96 kuyucuklu plaka içerisine 210 µL DPPH[•] radikali eklendi. Üzerine su ve metanol ekstralarından 15 µL farklı konsantrasyonlarda eklendi (kör için 15 µL metanol). 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm'de absorbansı okundu. Absorbanstaki azalma, ekstrenin serbest radikal giderme kapasitesini yani kalan DPPH[•] miktarını göstermektedir. Troloks standart antioksidan kaynağı olarak kullanıldı. Sonuçlar IC₅₀ (mg/mL) değerleri ile verildi. Başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu %50 azaltabilmek için gerekli antioksidan miktarı IC₅₀ ile ifade edildi.

3.2.2.2. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi tayini

ABTS^{•+} katyon radikal giderme yöntemi, ortamdaki mevcut antioksidanlar tarafından elektron transferiyle ABTS^{•+} çözeltisinin koyu yeşil olan rengin açılmasına ve sonuçta oluşan absorbans değerinde meydana gelen şiddet farklılığının ölçülmesi temeline dayanır. Antioksidan kaynak sayesinde ABTS^{•+} çözeltisinde renk açıldıkça, test edilmiş bitkinin ekstresi ya da diğer antioksidan kaynaklarda o derecede serbest radikal giderme etkisine sahip anlamına gelmektedir. Şekil 3.3'te bir antioksidan ile ABTS^{•+} radikalinin söndürülmesi verildi (79).



Şekil 3.3. ABTS^{•+} radikalinin bir antioksidan tarafından giderilmesi.

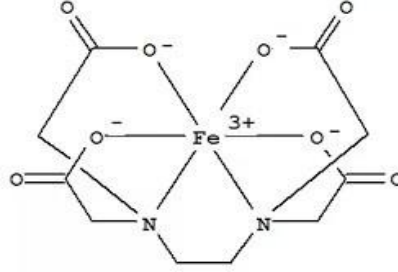
Yaptığımız bu çalışmada, *Alchemilla erzincanensis* türünün su ve metanol ekstraktlarının ABTS^{•+} katyon radikalini giderme aktivitesi tespiti için standart olarak trolox kullanılmıştır.

Bitki ekstraktlarının ABTS^{•+} radikal giderme kapasiteleri Re ve arkadaşlarının (1999) metoduna göre yapıldı (80). Öncelikle ABTS^{•+} radikalini oluşturabilmek için 7 mM ABTS çözeltisi ile 2,45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) çözeltisi 1:1 oranda karıştırıp reaksiyona sokuldu. Radikal, kullanılmadan öncesinde karanlıkta oda sıcaklığında 16 saat boyunca bekletildi. 96 kuyucuklu plaka içine su ve metanol ekstraktlarından 2,5 µL ve üzerine seyreltilmiş ABTS^{•+} radikalinden 250 µL eklenerek karıştırıldı ve 6 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 734 nm’de Microplate Reader yardımıyla absorbans okunması yapıldı. Standart olarak trolox kullanıldı. Sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak ifade edildi.

3.2.2.3. Metal şelatlama kapasite tayini

Bu metod Fe²⁺ iyonlarını bağlayabilmek için, etkili demir şelatlama özelliği olan ferrozin reaktifiyle ortamda olan diğer metal bağlayıcı antioksidan bileşiklerin yarışmaları temeline dayanır. Antioksidan kaynağının şelatlama etkisi ne kadar fazla ise kırmızı renkli olan Fe²⁺–ferrozin kompleksinin oluşması da o derecede

engellenmiş olur. Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) tarafından Fe^{2+} iyonunun şelatlanması Şekil 3.4’te verildi.



Şekil 3.4. Metal iyonunun EDTA tarafından şelatlanması

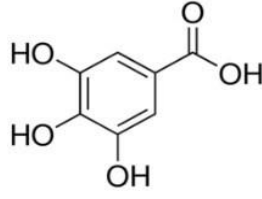
Yaptığımız bu tez çalışmasında, *Alchemilla erzincanensis* türünün su ve metanol ekstralarının metal şelatlama kapasitelerinin tespit edilebilmesi için standart olarak etkili bir şelatlama kapasitesine sahip olan EDTA kullanılmıştır.

Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre yapıldı (81). 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 50 μL ekstre/ EDTA eklendi. Üzerlerine 185 μL distile su ve 5 μL 2 mM FeCl_2 eklendikten sonra 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 10 μL 5 mM ferrozin eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonda bekletildikten sonra Microplate Reader yardımıyla 562 nm’de absorbans okundu. Bu metod için standart olarak EDTA kullanıldı. Sonuçlar IC_{50} değerleri olarak verildi.

3.2.3. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini

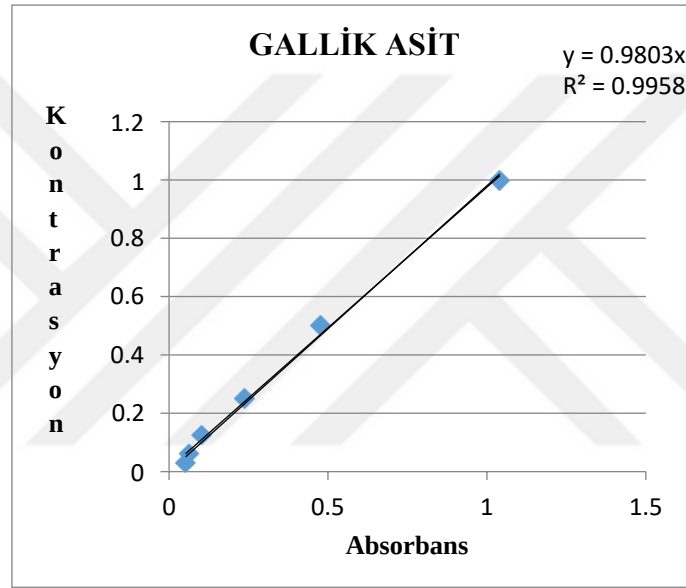
3.2.3.1. Toplam fenolik miktarı tayini

Alchemilla erzincanensis türünün su ve metanol ekstralarının toplam fenolik madde miktarı tayini için standart olarak bir fenolik bileşik olan gallik asit kullanıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Gallik asit'in kimyasal yapısı

Öncelikle gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı absorbands grafiği hazırlandı (Şekil 3.6).



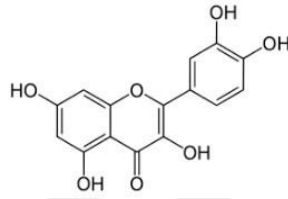
Şekil 3.6. Gallik aside ait standart eğri

Alchemilla erzinkanensis türünün toplam fenolik miktar tayini Singleton ve Rossi (1965) metoduyla yapıldı (82). 96 kuyucuklu plaka içine 200 µL %2'lik Na₂CO₃ ilave edildikten sonra üzerine 0,031–1 mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan su ve metanol ekstratlarından 10 µL (kör için 10 µL metanol) eklendi. 3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında 10 µL %20'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 750 nm'de absorbands okuması yapıldı. Standart olarak gallik asit kullanıldı. Oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisinden yola

ıkarak ekstrelerin sahip olmuş oldukları toplam fenolik miktarı tespit edildi. Toplam fenolik miktarı mgGAE/g ekstre olarak ifade edildi.

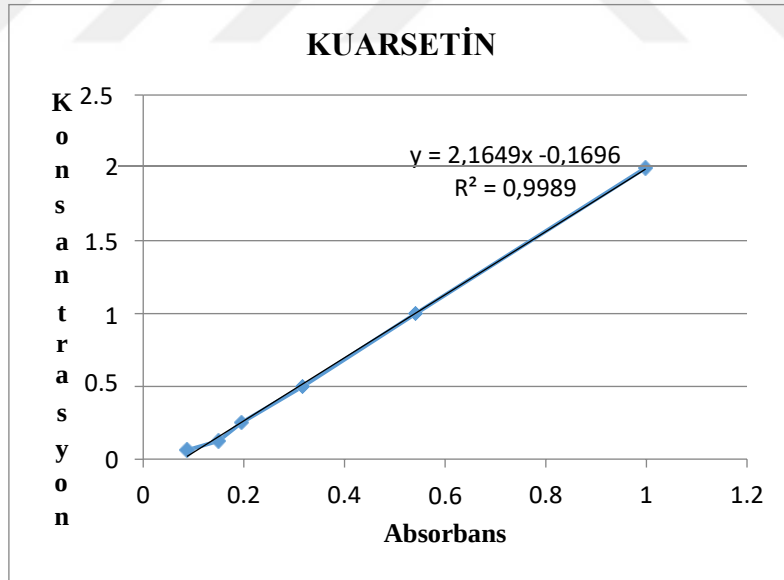
3.2.3.2. Toplam flavonoid miktarı tayini

Alchemilla erzincanensis türünün metanol ve su ekstrelerinin toplam flavonoid bileşik miktar tayini için standart olarak kuersetin kullanıldı (şekil 3.7).



şekil 3.7. Kuersetin

Bunun için önce kuersetinin farklı konsantrasyonlarına karşı standart absorbands eğrisi hazırlandı (şekil 3.8).



şekil 3.8. Kuersetin standart eğrisi

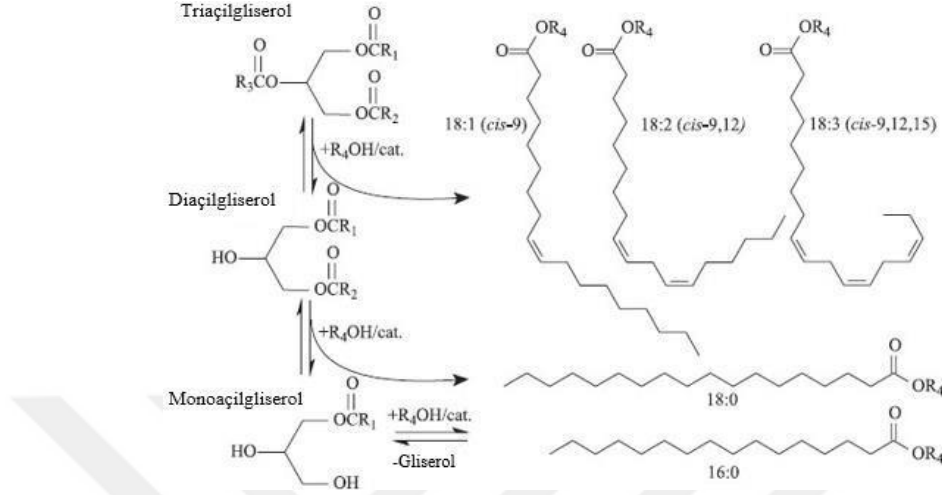
Alchemilla erzincanensis türünün toplam flavonoid miktarı tayini Zhishen ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan metodla yapıldı (83). 96 kuyucuk plaka içine

128 µL distile su koyuldu üzerine 0,25–2 mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan su ve metanol ekstrelerinden 10 µL (kör için 10 µL metanol) ilave edildi. Daha sonra 6 µL %5 NaNO₂ ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 6 µL %10 AlCl₃ ilave edilerek tekrar oda sıcaklığında 6 dakika inkübe edildi. En son 40 µL 1 M NaOH ilave edildi ve 415 nm’de absorbans okundu. Daha önce hazırlanan kuarsetin kalibrasyon eğrisi grafiğinden ekstrelerin toplam flavonoid miktarı tespit edildi. Toplam flavonoid bileşik miktarı mgQE/g ekstre olarak ifade edildi.

3.2.4. *Alchemilla erzincanensis* türünün yağ asidi profilinin belirlenmesi

Alchemilla erzincanensis’in yağ asidi profilinin analizinde gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS)-sistemi kullanılmıştır. Bunun için; 15 m x 0.25 mm x 0.25 µm film kolon kullanıldı. Dedektör olarak MS-Electron İmpact dedektör kullanıldı. Sistem aplikasyonu 40°C–320°C aralığında 5°C/dk artacak şekilde sıcaklık gradienti oluşturuldu. Bu çalışmada hekzan ekstresi bitkinin yağ asidi profili belirlenirken kullanıldı. Ekstre bu işlem için Uluslararası Yağ Komisyonu (IOOC) ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından yayınlanan trans esterifikasyon prosesi raporlarına göre türevlendirilerek metil esterlerine dönüştürülmüştür (84). Bu işlem için 5 mL’lik bir vidalı kapaklı test tüpü içine yaklaşık 0,1 g kuru hekzan ekstresi koyuldu. Üzerine 2 mL hekzan ilave edildikten sonra çalkalayarak hekzan ekstresi çözündürüldü. Sonrasında oda sıcaklığında 0.2 mL 2M metanolik KOH eklenerek kapağını kapatmak suretiyle 30 saniye vortekslenerek homojenize edildi. Üst faz berraklaşınca kadar fazlar ayrılmaya bırakıldı. Metil esterleri içeren üst kısım dekantasyonla alındıktan sonra

GC-MS ile analizleri yapıldı. Triaçilgliserollerin esterifikasyon reaksiyonları Şekil 3.9'da verildi.



Şekil 3.9. Triaçilgliserollerin esterifikasyonu

3.2.5. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.5.1. Hücre kültürü

Laboratuvar ortamında hücrelerin kontrollü bir şekilde çoğaltılması durumuna hücre kültürü denir. Hücrelerin çok hızlı bir şekilde yetiştirilmesi ve çoğalması bu metod ile sağlanmaktadır. Ayrıca, birçok biyokimyasal ve moleküler çalışma çoğaltılmış olan bu hücrelerde yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında MCF-7 (meme adenokarsinoma) ve MDA-MB 453 (meme adenokarsinoma) olmak üzere iki farklı hücre hattı kullanıldı. MCF-7 ve MDA-MB 453 hücre hatları, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilinstreptomisin (Pen-Strep) çözeltisi içeren EMEM besiyeri içinde kültüre edilmiştir. Kültürler %5 CO₂ ve %95 nem ile 37°C' de inkübe edilmiştir. Biyo Güvenlik Kabininde (Sınıf II) hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.3.2.5.2. Hücrelerin çözündürülmesi

37°C su banyosunda sıvı azottan alınan kriyo tüpler çözündürüldükten sonra T75 hücre kültürü flasklarına aktarıldı. Üzerlerine büyüme ortamını oluşturmak için 7–8 mL taze besi yeri ilave edildi ve ardından 24 saat boyunca CO₂ inkübatöründe (37°C) inkübasyona bırakıldı.

3.2.5.3. Hücrelerin pasajlanması

Belli bir konfluense (%80) ulaşan hücrelerin içerisinde bulundukları besi yeri ortamı uzaklaştırıldı ardından 4–5 mL PBS tamponuyla yıkandı. Sonrasında, flask içinde tabana yapışık büyüyen hücrelerin tabandan kaldırılmaları için 3–4 mL tripsin/EDTA ilave edildi ve CO₂ inkübatöründe 5–10 dakika inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, tripsinin etkisini geçirmek için, 8 mL taze besiyeri ilave edildi. 5 dakika 800 x g’de santrifüj edilen hücre süspansiyonundan süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 10 mL taze besiyeri eklenmiştir. Daha sonra 4 adet yeni T75 flask içine dağıtıldı. Pasajlanan hücre kültürleri 37°C’de %95 oranında nem bulunan %5 CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı.

3.2.5.4. Hücrelerin dondurulması

Pasajlanan hücreler %80 oranında bir doluluğa ulaşmasının ardından deney basamaklarında kullanılmak maksadıyla dondurma işlemine tabi tutuldu. Bunun için, CO₂ inkübatöründen alınan flasklar içindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve 4–5 mL PBS tamponuyla yıkandı. Flask içinde tabana yapışık bir şekilde büyüyen hücrelerin tabandan kalkmaları için üzerlerine tripsin/EDTA çözeltisinden 2–3 mL ilave edildi ve hücre tipine bağlı olarak 5–10 dk CO₂ inkübatöründe inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun süresi dolduğunda 8–10 mL taze besi yeri ortamı tripsinin inaktivasyonu için flask içine eklenmiştir. Devamında, 15 mL’lik falkon tüplerine

hücre süspansiyonu aktarıldı ve 37°C de 5 dk 800 × g de santrifüj edildi. Pelet yeterli bir büyüme ortamında (%10 DMSO içeren 3 mL dondurma ortamı) süpernatant kısmının uzaklaştırılmasının ardından tekrardan süspansiyon haline getirildi sonrasında 1,5 mL’lik kriyotüplere aktarıldıktan hemen sonra -80°C dondurucuya koyuldu. Bir günlük süre zarfından sonra kriyotüpler içine alınan hücre hatları -96°C’de sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2.5.5. Hücre sayımı

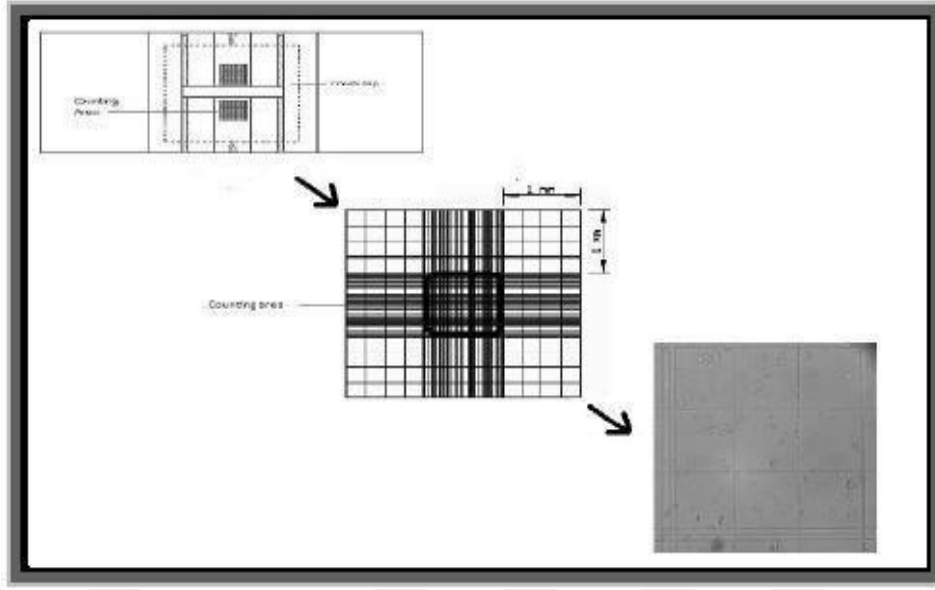
Tripan mavisi canlı ve cansız hücreleri birbirlerinden ayırma ve hücre sayısı belirlemede kullanılır. Cansız hücreler boya dışlama tekniğinde boyayı hücre içerisine aldıklarından mavi renkte görünür, canlı hücreler ise bu boyayı dışladıkları için parlak renkte görünmektedirler. Sayımını yaptığımız hücre süspansiyonundan belli miktarda alıp 2 mL’lik ependorf tüpe aktarıldı ve tripan boyasıyla yoğunluğa bağlı olarak belli ölçüde karıştırılarak hemositometrenin her iki odacığına’da 10 µL aktarıldı ve devamında inverted mikroskop altında hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.10).

Şu formül kullanılarak hücre konsantrasyonu belirlendi:

$$\text{Hücre sayısı} / \text{mL} = \text{Odacıklardaki ortalama hücre sayısı} \times DF \times 10^4$$

DF: Seyreltme faktörü.

10⁴: Toma lamındaki odacık boyutlarından kaynaklanan faktör. (hemositometredeki odaların boyutları 1 cm uzunlukta, 0,1 cm yüksekliğinde ve 1 cm enindedir. Hacim ise 1 mm³ veya 0,1 cm³ tür.)



Şekil 3.10. Hemositometre ile hücre sayımı

3.2.6. Antiproliferatif aktivite testleri

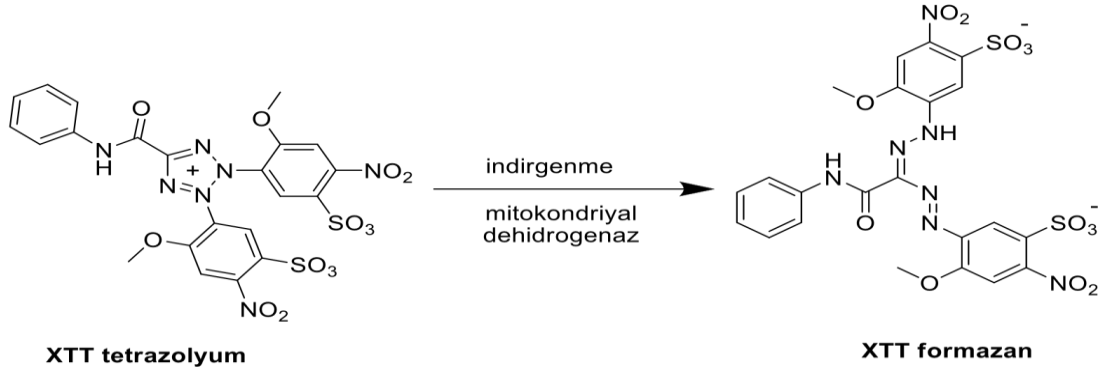
3.2.6.1. Ekstrelerin hazırlanması

Kuru toz haline getirdiğimiz bitkinin metanol ve su ekstraktlarının antiproliferatif aktivitelerini belirleyebilmek için ekstraktlardan ana stok çözelti olarak 1 mg/mL hazırlandı. Bunun için; ekstraktların her birinden 10 mg alınarak %0,2 DMSO içeren 10 mL besi yeri içinde çözdürüldü. Sonrasında besi yeri ile bu stoklar seyreltilip değişik konsantrasyonlarda (10–100 µg/mL) hücre süspansiyonları hazırlandı.

3.2.6.2. Hücre canlılığı ölçümü

Hücre canlılığı ölçümü XTT yöntemi ile yapıldı. XTT kiti ile örneklerin mevcut hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı (Hücre Proliferasyon XTT Kiti BI). Bu metodda suda çözünmeyen XTT tetrazolyum tuzu, suda çözünen turuncu renkli formazan bileşiğine metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal enzim aktivitesiyle indirgenmektedir

ve meydana gelen bu ürün ELISA mikroyayt okuyucu ile 450–490 nm aralıklarında çok kolay nicelleştirilmektedir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. XTT tetrazolyum fenazin metosülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazana indirgenmesi

Ekimi yapılacak olan hücrelerden 100'er μL (5000 hücre/mL) 96 kuyucuklu plakalara ilave edildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardaki mevcut besi yerleri inkübasyon süresi dolduğunda uzaklaştırılmış, kuyucuklar 50 μL PBS tamponuyla yıkanarak bu tampon yeniden uzaklaştırılmıştır. Sonrasında, 50'şer μL taze tam besi yeri bu hücrelerin üzerlerine konulmuştur. Daha sonra 50'şer μL farklı dozlarda (10-100 $\mu\text{g/mL}$) örneklerden üzerlerine eklendi. Akabinde 100 μL , %0.2 DMSO içeren tam besiyeri kontrol kuyucuklarına koyuldu. Plakalar tekrar 37°C' de %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübator içine 24 saat inkübasyon için konulmuştur. ELISA mikroyayt okuyucuda plakalar inkübasyon sonrasında 450 nm'de kolorimetrik olarak okundu. 96 kuyucuklu plakada XTT tahlillerinin gösterimi Şekil 3.12'de verildi.

G. sphaerocephala ekstrere (mg/ml)												
	Kontrol	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1	2.5	5		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.12. *Alchemilla erzincanensis* ekstrelerinin XTT analizinin 96 kuyucuklu plaka gösterimi

A1–A12, H1–H12, A1–H1 ve A12–H12 kuyucukları boş bırakıldı. B2–B11 ve C2–C11 arasındaki kuyucuklar hücre-siz, D2–D11 ve G2–G11 arasındaki kuyucuklar hücreli, B2–C2 kuyucukları ise kontrol grubunu oluşturmaktadır. 50 µL besiyeri ve %0,1 DMSO içeren besiyeri bu kuyucuklara eklenmiştir. 50 µL besiyeri ve üzerlerine 50 µL hazırlanmış olan bitki ekstrelerinden artan konsantrasyonlarda (10-100 µg/ml) B3–B11 arasında bulunan kuyucuklara ilave edildi. Plakalar içerisindeki herbir kuyucuğa inkübasyon zamanı dolduğunda 50’şer µL XTT kiti (5 mL XTT kitinin üzerine 100 µL aktivatöründen ilave edilerek hazırlandı) koyuldu ve 5 saat boyunca CO₂ inkübatöründe bekletildi. İnkübasyonun süresi dolduğunda, plakalar elisa mikroplyt okuyucuda 450 nm’de okunmuştur. Aşağıda verilen formülü kullanarak kuyucuklarda mevcut olan hücre canlılığı hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre proliferasyonu} = \frac{[\text{Abs (muamele görmüş hücreler)}]}{[\text{Abs(control hücreler)}]} \times 100$$

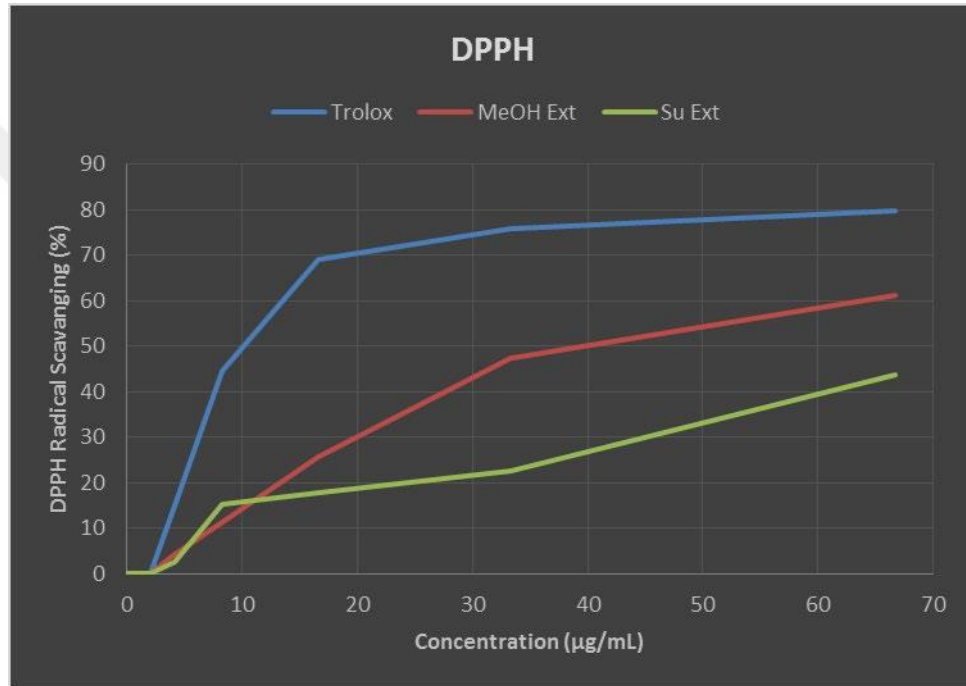
Elde edilen sonuçlar kullanılarak standart ajanın ve bitki ekstrelerinin IC₅₀ değerleride hesaplandı (hücre canlılığını %50 azaltabilmek için gerekli olan numune konsantrasyonu IC₅₀ değeri olarak adlandırılmaktadır).

4. BULGULAR

4.1. Antioksidan Aktivite Bulguları

4.1.1. DPPH• radikal giderme aktivitesi bulguları

Standart antioksidanların ve ekstrelerin %DPPH gidermeleri Şekil 4.4’de grafik ile verildi. Standart antioksidanların ve ekstrelerin IC₅₀ değerleri ise Tablo 4.1’de verildi.



Şekil 4.1. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstrelerinin DPPH radikal giderme aktiviteleri

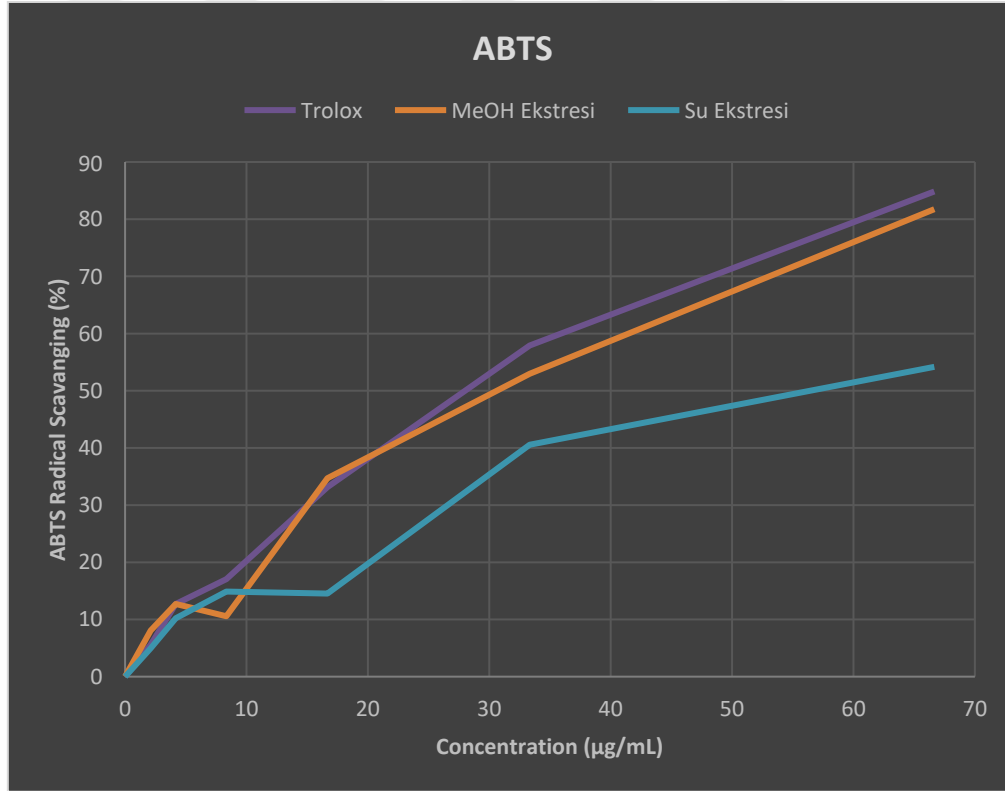
Tablo 4.1. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstralarının ve standart antioksidan bileşiklerinin DPPH radikal giderme kapasiteleri

Örnekler	DPPH Radikal Giderme($\mu\text{g/mL}$)
ME	47.92 $\pm$ 0.08
SE	74.47 $\pm$ 0.05
Trolox	26.66 $\pm$ 0.04

ME: Metanol ekstresi, SE: Su ekstresi

4.1.2. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi bulguları

Standart antioksidanların ve ekstraların %ABTS^{•+} gidermeleri Şekil 4.6' da grafikte gösterildi. Standart antioksidanların ve ekstraların IC₅₀ değerleri ise Tablo 4.2' de verildi.



Şekil 4.2. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstralarının ABTS^{•+} radikal giderme aktiviteleri

Tablo 4.2. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstreleri'nin ve standart antioksidan bileşiklerin ABTS radikal giderme kapasiteleri

Örnekler	ABTS ^{•+} Radikal Giderme
IC ₅₀ (µg/ml)	
ME	36.4±0.07
SE	56.3±0.04
Trolox	34.4±0.04

ME: Metanol ekstresi, SE: Su ekstresi

4.1.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları

Fe²⁺ iyonunu EDTA'nın ve ekstrelerin şelatlama kapasitesi değerleri ise IC₅₀ değerleri olarak Tablo 4.3.'de verildi.

Tablo 4.3. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstrelerinin ve EDTA'nın metal şelatlama kapasiteleri

Örnekler	Fe ²⁺ Şelatlama
IC ₅₀ (µg/ml)	
ME	11812,22±0.58
SE	5702,55±0.33
EDTA	74,49±0.11

ME: Metanol ekstresi, SE: Su ekstresi.

4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı Bulguları

4.2.1. Toplam fenolik miktarı bulguları

Alchemilla erzincanensis türünün su ve metanol ekstrelerinin elde edilen standart grafik yardımı ile toplam fenolik bileşik miktarı GAE olarak hesaplandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstralarının toplam fenolik madde içerikleri

Örnekler	Fenolik maddemiktarı (mg GAE/g ekstre)
ME	423±0.01
SE	440±0.02

ME: Metanol ekstresi, SE: Su ekstresi.

4.2.2. Toplam flavonoid miktarı bulguları

Alchemilla erzincanensis türünün su ve metanol ekstralarının elde edilen kuersetin standart grafik yardımıyla toplam flavonoid miktarı kuersetin eşdeğer miktarı (QE) olarak ifade edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstralarının toplam flavonoid içerikleri

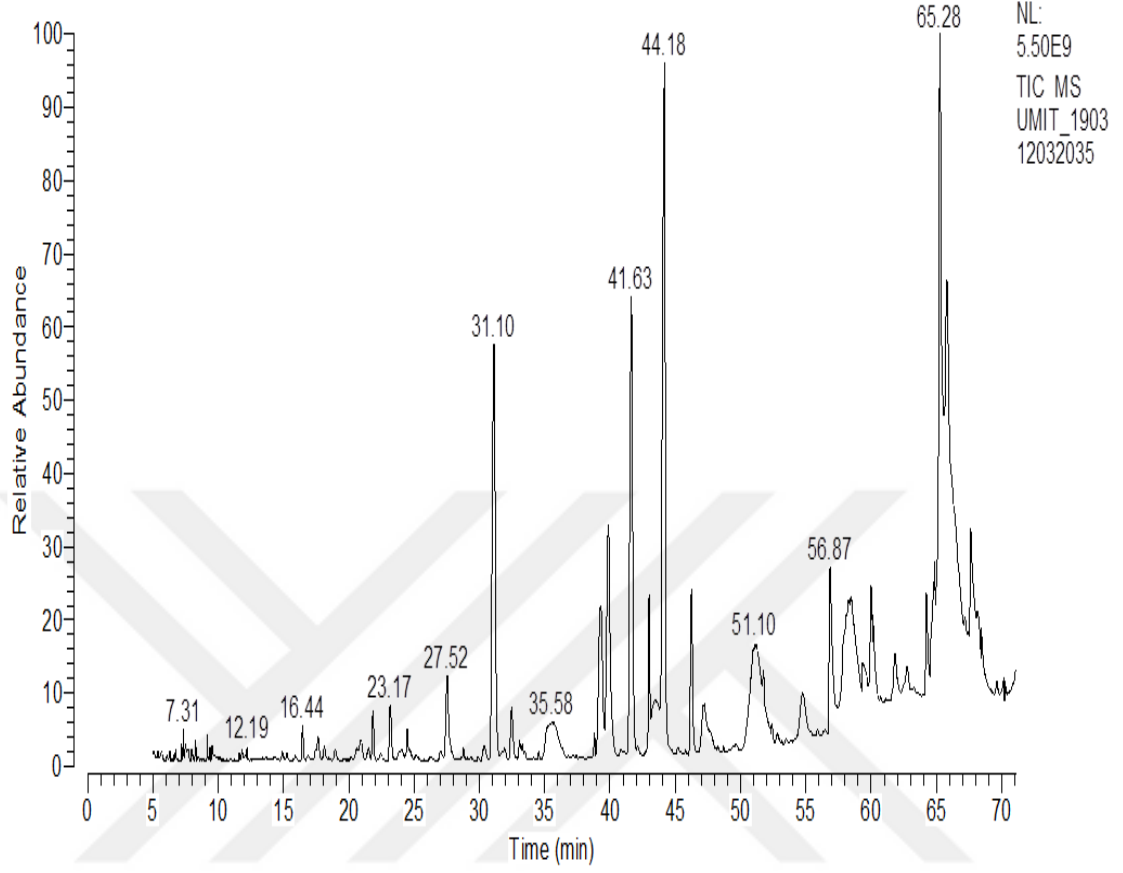
Örnekler	Flavonoid miktarı (mg QE/g ekstre)
ME	226±0.03
SE	273±0.02

ME: Metanol ekstresi, SE: Su ekstresi.

4.3. *Alchemilla erzincanensis* Türünün GC-MS Analiz Bulguları

Alchemilla erzincanensis türünün Şekil 4.12’de hekzan ekstresinden ele geçirilen GC-MS kromatogramı verilmekte. Yapılan analizler doğrultusunda bitkinin içeriğinde bir kısmı eser miktarda bir kısmı ise yüksek oranda toplamda 36 tane esansiyel yağ bileşeni tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin alıkonma süreleri, kütüphane bilgileri, isimleri ve % bolluk oranları Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

RT: 0.00 - 71.12 SM: 7B



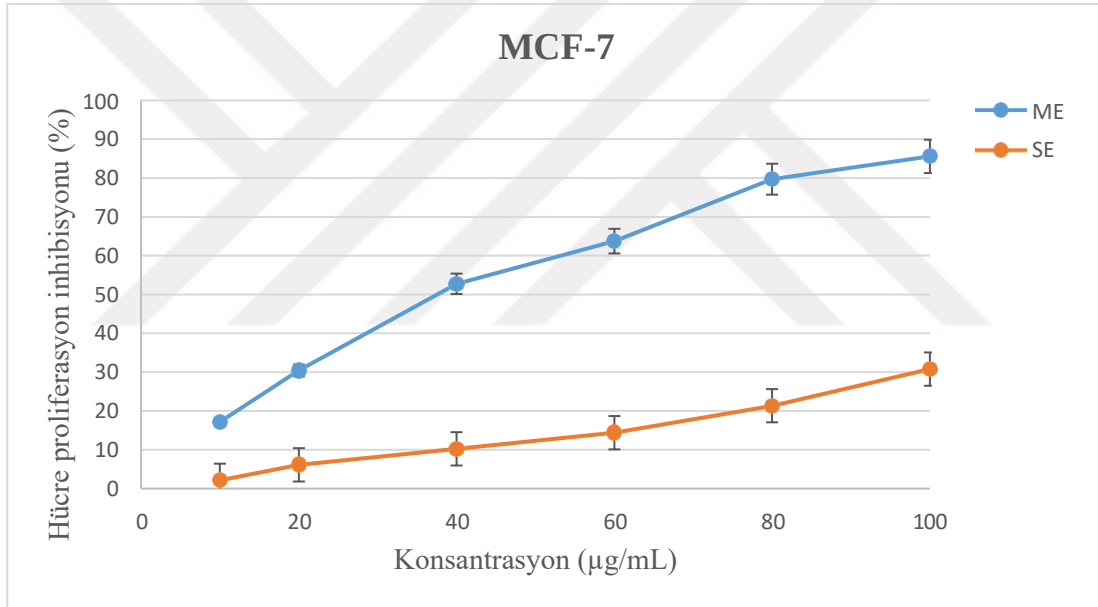
Şekil 4.3. *Alchemilla erzincanensis* türünün GC-MS kromatogramı

Tablo 4.6. *Alchemilla erzincanensis* türünün yağ asidi profili

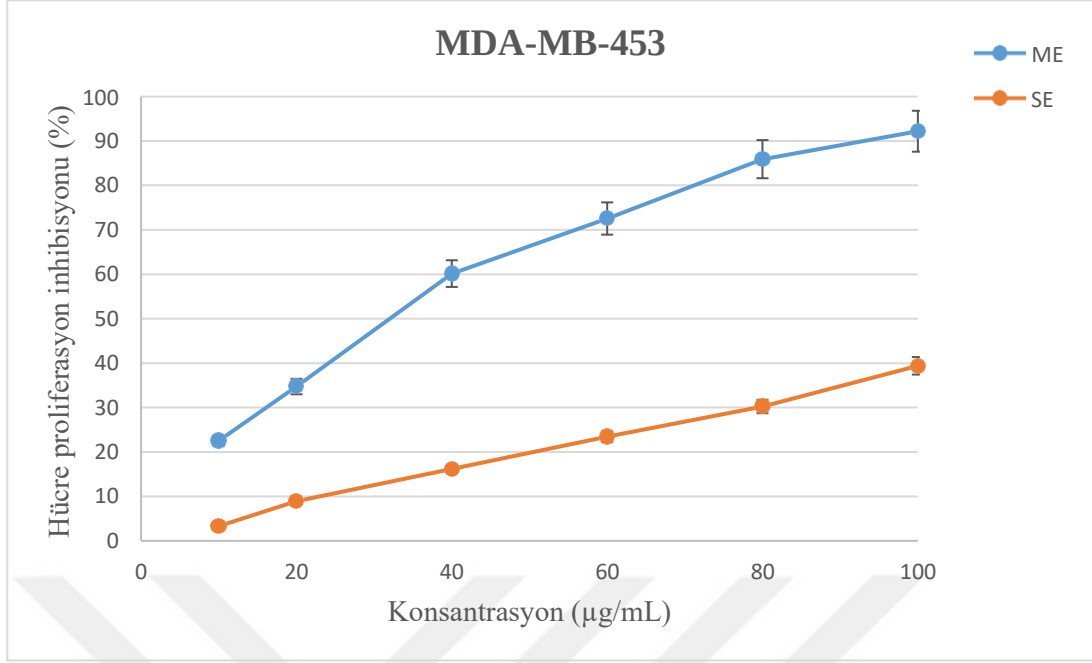
No	Bileşik Adı	RT	%Bolluk
1	2,2,8,8-tetrametil-6-oxatetracyclo [7.2.1.0 ^{1,7} ,0 ^{5,7}] dodecane	44.18	15.77
2	Lavral aldehit	5.65	0.17
3	Benzen, 1-metil-4-(1-metiletil)-	7.48	0.15
4	Benzen, 1,3-dietil-	6.27	0.01
5	Benzen, 2-etil-1,4-dimetil-	8.24	0.27
6	Undecsilik asid, 2-metil-	7.18	0.16
7	Nonanal	7.31	0.29
8	Risinoleik asit	47.69	0.14
9	Vitamin A aldehit	47.69	0.14
10	1-Heksanol, 2-etil-	9.14	0.21
11	Benzoik asit, metil ester	12.19	0.13
12	Dodokanoik asit, metil ester	16.44	0.54
13	7-Phenyl-1-heptyl chloride	17.63	0.24
14	Tridekanoik asit, metil ester	23.17	1.02
15	10-Undekanoik asit, metil ester	24.66	0.33
16	Heksadekanoik asit, metil ester	31.11	10.55
17	2-Tridecanone	27.52	1.56
18	Caprolactam	28.78	0.14
19	Kaprilik asit, metil ester	39.87	4.91
20	1,2-Benzendikarboksilik asit	43.00	2.13
21	Eicosane	51.10	0.85
22	Undecanol	46.23	2.86
23	Arakidik asit, metil ester	47.14	0.69
24	Digitoksin	59.33	1.24
25	Dioktil ftalat	48.69	0.10
26	Heneicosane	50.99	0.55
27	Heptadekanoik asit, metil ester	54.73	1.11
28	n-Heksadekanoik asit	56.85	2.90
29	1-Tridecene	60.00	1.71
30	9-Kaprilik asit	64.23	1.58
31	Didodesil ftalat	65.81	3.55
32	Dimetil ftalat	38.80	0.32
33	Cyclopentadecanol	5.37	0.07
34	Vitamin A aldehit	7.70	0.11
35	9-Oktadekanoik asit, metil ester	65.27	8.60
36	1,2,4,5-Tetrametil benzen	9.36	0.16

4.4. *Alchemilla erzincanensis* Türünün Antiproliferatif Aktivite Araştırma Bulguları

Alchemilla erzincanensis türünün metanol ve su ekstraktları'nın XTT metodu ile MCF-7 ve MDA-MB-453 kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri araştırıldı. Bitki ekstraktlarının test edilmiş olan hücre hatları üzerindeki diğer konsantrasyonlarına karşı 24 saatlik inkübasyonun sonucunda % hücre proliferasyon inhibisyonları Şekil 4.13. ve 4.14.'da. verildi. Pozitif kontrol olarak 5-FU (5-Fluorourasil) kullanıldı. Ekstrelerin ve 5-FU'nun IC₅₀ değerleri ise Tablo 4.7.'de verildi.



Şekil 4.4. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstraktlarının MCF-7 kanser hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri



Şekil 4.5. *Alchemilla erzincanensis* türünün metanol ve su ekstralarının MDA-MB-453 kanser hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri

Tablo 4.7. *Alchemilla erzincanensis* türünün meranol ve su ekstralarının MCF-7 ve MDA- MB 453 kanser hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri

<i>Alchemilla erzincanensis</i>	MCF-7(µg/mL)	MDA-MB-453(µg/mL)
ME	41.18 ± 1.15	34.07 ± 1.55
SE	169.02 ± 2.35	128.50 ± 1.96
5-FU	18.1 ± 0.45	12.35 ± 0.72

ME: Metanol ekstresi; SE: Su ekstresi; 5-FU: 5-Florourasil.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1. Fenolik ve Flavonoid İçerik Sonuçları

Günümüzde birçok farklı formülasyonlar ve bitki özütü türetilmiştir. Bu özütler alternatif tıpta yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bitki ekstralarının zengin fitokimyasal içeriklerinin çeşitli biyolojik etkilerinin olabileceği belirtilmiştir (86). Bu sebeple biyolojik aktivite potansiyelleri arasında bir korelasyon kurmak için bitki özütlerinin fitokimyasal içeriği çok önemlidir. Yaptığımız bu tez çalışmasında *Alchemilla erzincanensis* ekstralarının fitokimyasal bileşimi kalitatif ve kantitatif analizler yapılarak incelendi. Yaptığımız kolorimetrik deneyler sonucunda bitkinin toplam flavonoid ve fenolik içeriği açısından bir hayli zengin yapıda olduğu tespit edildi.

Alchemilla erzincanensis türünün su ve metanol ekstralarının sırasıyla fenolik içerikleri 440 mg GAE/g eks. ve 423 mg GAE/g eks. olarak belirlendi. Flavonoid içerik sonuçları ise sırasıyla 273 mg QE/g eks. ve 226 mg QE/g eks. olarak bulundu. Elde edilen sonuçlarımız neticesinde su ekstresinin metanol ekstresine kıyasla flavonoid ve fenolik içerik bakımından çok daha zengin olduğunu göstermektedir.

Literatürde yapılan incelemelerde 2013 yılında *Alchemilla L.* cinsine ait *Alchemilla holotricha*, *Alchemilla persica* ve *Alchemilla cimilensis* isimli 3 farklı tür üzerinde yapılan bir çalışmada su ekstralarının sırasıyla fenolik madde içerikleri 48.167 mg GAE/g, 52.747 mg GAE/g, 57.065 mg GAE/g metanol ekstralarının fenolik içerikleri ise sırasıyla 45.9 mg GAE/g, 54.155 mg GAE/g, 57.538 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Flavonoid madde içerikleri yine sırasıyla su ekstraları 9.859 mg C/g, 9.736 mg C/g, 10.116 mg C/g metanol ekstralarının fenolik içerikleri sırasıyla 11.294 mg C/g, 13.546 mg C/g, 12.834 mg C/g olarak bulunmuştur (87).

Alchemilla erzincanensis ile karşılaştırıldığında fenolik ve flavonoid içeriği bakımından *Alchemilla erzincanensis* türünün oldukça zengin olduğu görülmüştür.

5.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Yaptığımız bu çalışmada *Alchemilla erzincanensis* türünün su ve metanol ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri ABTS ve DPPH radikallerini giderme aktiviteleri ve demir (II) iyonlarını şelatlama aktiviteleri üzerinden değerlendirildi. DPPH ve ABTS radikalleri antioksidan radikal süpürme etkilerini değerlendirmede oldukça yaygın kullanılmaktadırlar (88). Bu nedenle *Alchemilla erzincanensis* türüne ait ekstrelerin radikal giderme kapasitelerinin incelenmesinde iki farklı radikal test sistemi (ABTS ve DPPH) kullanıldı. Tablo 4.1'e bakılıp incelendiğinde, *Alchemilla erzincanensis*'in metanol ekstresinin DPPH radikal süpürme kapasitesinin (IC_{50} : 47,92 $\mu g/mL$) su ekstresinin kapasitesinden (IC_{50} : 74,47 $\mu g/mL$) daha yüksek olduğu görülmektedir.

2013 yılında *Alchemilla holotricha*, *Alchemilla persica* ve *Alchemilla cimilensis* isimli 3 farklı tür üzerinde yapılan bir çalışmada artan konsantrasyonlarda DPPH giderme aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (87).

ABTS radikal süpürme kapasitesinde ise metanol ekstresinin kapasitesinin (IC_{50} :36.4 $\mu g/mL$) su ekstresinden (IC_{50} :56.3 $\mu g/mL$) yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).

Uygulanan metodoloji deney koşullarını, solvent polaritesindeki farklılıkları ve antioksidan aktivite sonuçlarını etkilemektedir (89). Bitki özlerindeki flavonoidler, vitaminler, kükürt bileşiklerin varlığı ve fenolik asitler antioksidan aktiviteyi etkilerler (90, 91). Lipid peroksidasyonunu geçiş metalleri uyarabilirler. Hidroksil radikallerin üretilmesini sağlayıp lipit peroksidasyonunu hızlandırarak,

lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonunun devam etmesine fenton reaksiyonu sebep olur. Bundan dolayı bitki türlerinin antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesinde metal şelatlama kapasitesi tayini oldukça önemli bir yerdedir.

Jonadet ve arkadaşlarının 1986 yılında yaptıkları bir çalışmada *Alchemilla* türlerinde de antioksidan aktivitenin bulunduğu belirtilmektedir (92).

Tablo 4.3 incelendiğinde *Alchemilla erzincanensis*'in, su ekstresinin metal şelatlama aktivitesi (IC_{50} : 5702.55 $\mu\text{g/mL}$) metanol ekstresinin metal şelatlama aktivitesinden (IC_{50} : 11812.22 $\mu\text{g/mL}$) daha yüksek olduğu görülmektedir. Metal şelatlama kapasitesi tayini için standart olarak EDTA kullanılmıştır. Su ve metanol ekstrlerinin metal şelatlama kapasiteleri EDTA'nın (IC_{50} : 11.73 $\mu\text{g/mL}$) altında olduğu tespit edildi. EDTA'nın metal şelatlama kapasitesi daha yüksektir ancak ekstrlerinin IC_{50} değerlerinden anlaşıldığı üzere metali şelatlama özellikleri vardır.

Topal'ın 2013 yılında *Alchemilla holotricha*, *Alchemilla persica* ve *Alchemilla cimilensis* türlerinde yaptığı çalışmada hem standart olarak kullanılan maddelerde hem de çeşitli çözücü ekstrlerinde konsantrasyon arttıkça metal şelatlama aktivitesinin de arttığını belirtmektedir (87).

5.3. Yağ Asidi İçeriği Sonuçları

Alchemilla erzincanensis'in hekzan ekstresiyle yaptığımız GC-MS analizleri sonucunda hexadecanoic acid, 9-Kaprilik asit-metil ester, heptadekanoik asit metil ester ve 2,2,8,8-tetrametil-6 oksatetrasiklo [7.2.1.0^{1,7}.0^{5,7}] dodocane, didodesil ftalat bakımından zengin olduğunu tespit ettik (Tablo 4.6).

Alchemilla türleri yüksek rakımlardaki çayır bölgelerinde yetişen mera bitkileri oldukları için, yayılış gösterdikleri alanlarda otçul beslenen hayvanlar tarafından tüketilmektedirler. Bu bitkiyi yiyen hayvanların bağırsak floralarında

değişikliklere yol açmakta, bu hayvanların sütlerinin tadında ve içeriğinde farklılıklar olduğunu belirten çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle bu cinsin uçucu yağ profili önem arz etmektedir (93). 9-Kaprilik asit metil ester; insan idrarında ve kanında bulunur. Endojen peroksizom proliferatör aktifleştirici reseptör ligand olarak görev yaptığı, antikarsinojenik ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, antibiyotiklerin sentezinde modülatör olarak kullanılan bu bileşiğin türevleri önemli elemnlardır. Octadecanoik asit methyl ester düşük pH'da potansiyel antibakteriyel ve antifungal etki göstermektedir. Dimetil ftalat, endüstriyel kimyasallarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada yaklaşık 60 farklı tipte üretilen bu kimyasallar, endüstriyel faaliyetlerde hammadde veya yardımcı kimyasal gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Ftalat grubuna ait organik bir madde olan düşük molekül ağırlıklı dimetil ftalat (DMP), peroksitlerin depolanması ve taşınması için seyreltme stabilizatörü olarak kullanılmaktadır. Digitoxin, Avrupa'da ormanların altında yetişen, digitoxin, *Folia digitalis* adı verilen *Digitalis purpurea* (*Scrophulariaceae*) bitkisinin yapraklarından elde edilir (93).

Caprolactam; su, eter, alkol ve benzende kolay çözünen heterosiklik yapıda beyaz kristal maddedir. Bu molekül polimerlerin üretiminin temelini oluşturmaktadır. Bir poliamid reçinesinde su, alkol ve aminlerin valığında ısı kaprolaktamın polimerizasyonuna yol açar.

Benzoik asit; esterlenmiş şekli metil benzoattır. Metil benzoat $C_6H_5CO_2CH_3$, kimyasal formüle sahip bir moleküldür. Suda az çözünür, ancak organik çözücülerle karıştırılmış renksiz bir sıvıdır. Metil benzoat, hoş bir kokuya sahiptir ve parfümeride kullanılır. Ayrıca çözücü olarak ve bazı böcekleri kovucu olarakda kullanılır.

Vitamin A (retinaldehit olarak da bilinir); Retina, A vitamini grubundandır. Retinal, opsin adı verilen proteinlere bağlanarak görmenin kimyasal temelini oluşturur. Retinaldehit bazı mikroorganizmalarda ışığı metabolik enerjiye dönüştürür. Omurgalılar retinalı doğrudan etten alırlar ya da karotenoidlerden (karotenler (α -karoten veya β -karoten) veya β -kriptoksantin, bir ksantofil türü) üretirler. Karotenoidler fotosentetik organizmalardan elde edilebilir. Retinolden, retinol ve kısmen aktif formu olan retinoik asit üretilebilir. Böcekler ve kalamar gibi omurgasızlar, görsel sistemdeki diğer ksantofillerin dönüşümünden kaynaklanan hidroksillenmiş retinal formları kullanır. Her biri bir benzen halkası ve iki etil ikamesinden oluşur. Hepsi renksiz sıvılardır.

Duren veya 1,2,4,5-tetrametilbenzen renksiz bir maddedir. Bu molekül bir alkilbenzen olarak sınıflandırılmıştır. Üç izomeri vardır: tetrametilbenzen (1,2,4,5-tetrametilbenzen), prehniten (1,2,3,4-tetrametilbenzen) ve izoduren (1,2,3,5-tetrametilbenzen). Durene, çok yüksek bir erime noktasına (79.2°C) sahiptir. Nükleofilisite fenol ile karşılaştırılabilir. Örneğin, bir halkada kolayca halojenlenir. Nitrasyon, durokinonun öncüsü olan dinitronun bir türevini verir. Endüstride sertleştirici, yapıştırıcı ve kaplama üretiminde kullanılan piromellitik dihidritin öncüsüdür. Mühendislik plastikleri (poliimidler) ve alkid reçineleri için çapraz bağlayıcılar için bazı hammaddelerin üretiminde kullanılır. Heksametilbenzen de sentez için uygun bir başlangıç malzemesidir (82).

Risinoleik asit; doymamış omega-9 yağ asitleri ve hidroksi asitlerdendir. Olgun hint bitkisi (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae) veya ergot sklerotia (*Claviceps purpurea* Tul., Clavicipitaceae) tohumlarından elde edilen tohum yağlarının önemli bir bileşenidir. Risinoleik asitten oluşan trigliserit hint yağında

bulunan yağ asidinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Erime noktası 5°C, kaynama noktası 230 ila 235°C'dir. Risinoleik asit hint yağının ana bileşeni olan ve hint yağındaki gliserin esterini içeren bir yağ asididir. Elyaf yağı maddesi (lif işleme için yüzey aktif madde) üretiminde kullanılır.

5.4. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

Alchemilla erzincanensis türünün metanol ve su ekstraktlarının anti-proliferatif aktiviteleri MDA-MB 453 ve MCF-7 hücre hatları üzerinden XTT metodu kullanılarak değerlendirildi.

Apoptoz mekanizmasında asıl rol ölüm reseptörleri, proteolitik enzimler (kaspazlar) ve adaptör proteinleridir (94). Ölüm reseptörleri, adaptör proteinlere reseptör gen familyasından olan Tumour Necrosis Factor (TNF) bağlanıp hücre içerisine dışardan gelen ölüm sinyallerini iletirler (95). Ölüm reseptörlerine örnek olarak TRAIL-R2, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1 (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand), DR6 ve CD95 (APO-1/Fas) verilebilir (96). Adaptör proteinler ölüm reseptörlerinden gelen sinyalin sonrasında devreye girip kaspazlara bağlanarak hepsini aktif duruma getirirler. Adaptör proteinlere örnek olarak REL proteinleri, WNT1, CD95, Fas, β -Catenin verilebilirler. Sonuç olarak, kaspaz dizisi adaptör proteinlerin etkileriyle aktifleşirler.

Bitki ekstraktlarının 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından hücre proliferasyon inhibisyon yüzdeleride Şekil 4.4 ve 4.5'da gösterildi. Ayrıca, pozitif referans ilaç olarak kullanılan 5-FU (5-Fluorourasil)'nın ve bitki ekstraktlarının IC₅₀ değerleri Tablo 4.7'de gösterildi. Şekil 4.4 ve 4.5 incelendiğinde test edilen hücre hatlarının proliferasyonlarının, bitki ekstraktları tarafından ciddi derecede inhibe edildiği görülmektedir. Maksimum konsantrasyonda (1 μ g/mL) su ve metanol

ekstrelerinin inhibisyon yüzdeleri, MCF-7 hücrelerine karşı %30.8 ve %85.6, MDA-MB 453 hücrelerine karşı %39.4 ve %92.2'dir. Ayrıca 5-FU'nun aynı konsantrasyonda MCF-7 hücre hattı üstündeki proliferasyon inhibisyonu %93.1, MDA-MB 453 hücre hattı için Transtuzumab kullanılmış olup 50 µg transtuzumab %15 inhibe ettiği tespit edildi.

Antikanser faaliyetlerini Tablo 4.7'yi dikkate alarak karşılaştırdığımızda, test edilen hücre hatlarına karşı metanol ekstraktının su ekstraktına göre daha fazla inhibisyon aktivitesi sergilediği görülmektedir.

Su ekstraktının MCF-7 ve MDA-MB 453 kanser hücre hatları üstündeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 169.02 µg/mL ve 128.50µg/mL iken metanol ekstraktının IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 41.18 ve 34.07 µg/mL'dir. Her iki ekstrede Tablo 4.7'de görüldüğü üzere test edilen tüm hücre hatlarına karşı pozitif kontrole göre ılımlı antikanser aktivite göstermiştir. IC₅₀ değerleri incelendiğinde, MDA-MB 453 kanser hücrelerine karşı bitkinin metanol ekstresinin daha yüksek ölçüde antiproliferatif aktivite gösterdiği görülmektedir. MDA-MB 453 kanser hücrelerinin ölüm reseptörleriyle metanol ekstresi'nin daha çok sinyal bağı kurarak onları uyarma konusunda daha etkili olması bunun sebebi olabilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmamızda Erzincan'a endemik bir bitki türü olan *Alchemilla erzincanensis*'in metanol ve su ekstrelerinin antiproliferatif aktiviteleri, antioksidan aktiviteleri ve fenolik madde içerikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bitkinin yağ asidi içeriği ise hekzan ekstresi üstünden nitel olarak belirlendi. Toplam flavonoid ve fenolik içerik testlerinde, bitkinin su ekstresinin metanol ekstresine göre daha fazla fenolik madde içerdiği belirlendi. Bitkinin esansiyel yağ içeriği bakımından ise GC-MS analizleri sonucunda yeterince zengin

içeriğe sahip olduğu belirlendi. Ayrıca 2,2,8,8-tetrametil-6-oksatetrasiklo dodocane (%15.77) Heksadekanoik asit (%10.55), 9-Kaprilik asit'in (%8.60) en fazla bulunan yapılar olduğu tespit edildi. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri dört farklı yöntem ile değerlendirildi. Uygulanan antioksidan aktivite testler sonucunda, su ekstresinin antioksidan kapasitesinin metanol ekstresinin antioksidan kapasitesine kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi. Aynı şekilde XTT yöntemi ile farklı iki hücre hattı üstünden değerlendirilen antiproliferatif çalışmalarında, metanol ekstresinin aktivitesinin su ekstresinin aktivitesine kıyasla daha fazla kapasite sergilediği gözlemlendi. Diğer taraftan her iki ekstrenin kemoterapötik ilaç (5-FU), transtuzumab ve referans antioksidan bileşikler (tokferol, troloks) ile kıyaslandıklarında orta derecede biyolojik aktivite sergilediği tespit edildi.

Kanser hastalıklarında alternatif tedavi seçeneklerinden birisi olarak bitkiler üzerinde yapılan daha önceki bir çalışmada 347 bitki ekstresi farklı dozlarda nöroblastoma hücreleri üzerinde uygulanmış ve sonuçları değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada *Alchemilla vulgaris* bitkisinin de orta derecede antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir (97). *Alchemilla* cinsine ait *Alchemilla erythropoda*, *Alchemilla ikizdereensis*, *Alchemilla oriturcica* ve *Alchemilla trabzonica* türlerinin ekstreleri HeLa hücrelerine uygulandığında düşük konsantrasyonlarda düşük toksik etki gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda toksik etkinin arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde ekstrelerin apoptotik ve nekrotik etkileri olduğu da kaydedilmiş olup özellikle *Alchemilla trabzonica* diğer türlerden daha yüksek toksik, apoptotik ve nekrotik etki gösterdiği belirtilmiştir (98).

Sonuç olarak; yaptımız bu tez çalışması ile *Alchemilla* türlerinin gelecekte kanser çalışmalarında önemli bir yere sahip olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Koçyiğit, M. (2005) Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
2. Gezgin, D. (2006) “Bitki Mitosları”, *Sel Yayıncılık*, İstanbul.
3. Richard, A. D. (2011) Plant biotechnology shapes up fort the 21.st century, *Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation*, OK, USA 1, 3-6.
4. Korukluoğlu, M., İrkin R., and Sertel S. (2006) Salmonella ve Shigella Türlerinin gelişmesini engelleyen tıbbi bitkiler ve Esansiyel yağlar, *Gıda Dergisi*, 31(6), 319-324.
5. Bozkurt, Y., ve Göker Y. (1981) Orman Ürünlerinden Faydalanma, *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları*, İ.Ü. Yayın No 2840, O.F. Yayın No 297.
6. Turan, F.A. (2000) Türkiye’de Halk İlacı Araştırmaları, *T.C. Kültür Bakanlığı*, Ankara.
7. Baytop, T. (1999) Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 2. Baskı, İstanbul.
8. Alpınar, K. ve Saçlı, S. (1997) Türkiye’deki Etnobotanik Çalışmalar Hakkında Bir Bibliyografya, *XI. BİHAT Bildiriler Kitabı*, Ankara, 157-167.
9. Akkuş, İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, *Mimoza Yayınları*, Konya, 106-111.
10. Henrikson, J. (1992) Cellular Metabolism and Endurance, Endurance in Sport, Editors Shephard RJ, Astrand PO, *Blackwell Science*, London.
11. Halliwell, B. (1996) Oxidative stres, nutrition and health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans, *Free Radical Research*, 25, 57-74.
12. Stadtman, E.R. (2002) Importance of individuality in oxidative stress and aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597-604.
13. Akdulum, B. (2011) *Echinacea pallida*’nın köklerindeki bileşiklerin izolasyonu, yapı tayini ve antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek

Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, 12.

14. Davies, K.J.A. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 279-289.
15. Köksal, E. (2007). Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, 1-50.
16. Halliwell, B. (1990). How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
17. Aksoy, Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü, *Klinik Tıp Bilimleri*, 22, 442-448. (Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2002-Cilt:22)
18. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
19. Gülçin, İ. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
20. Donaldson, W.E. (1994) Nutritional factors, *Introduction a Biochemical Toxicology, Second Edition*, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut.
21. Draper, H.H. (1990) Nutritional modulation of oxygen radical pathology, *Advances in Nutritional Research*, Plenum Press, New York, 119-145.
22. Ahmad, P., Jhon, R., Sarwat, M., and Umar, S. (2008) Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress, *International Journal of Plant Production*, 2(4), 353-365.
23. Halis Süleyman, Vahdet Gül, Ertuğrul Erhan. *Oksidatif Stres ve Doku Hasarı*. *Erzincan Tıp Dergisi*, Cilt:1 Sayı:1, Nisan 2018.
24. Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., and Durmaz, Y. (2006) Algal antioksidanlar, *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23, 85-89.

25. Hayrullah KARABULUT, Mehmet Şükrü GÜLAY, *Antioksidanlar, Mehmet Akif Ersoy Veteriner Fakültesi Dergisi*, Cilt :1 Sayı: 1,65-76, Nisan 2016
26. Kwee, J.K., Mitidien, E., and Alfonso, O.R. (1991) Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B 16 melanoma cells, *Cancer Letters*, 57, 199-202.
27. Fridovich, I. (1989) Superoxide Dismutases - an Adaptation to a Paramagnetic Gas. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14): 7761-7764.
28. Gaetani, G., Ferraris, A., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., and Kirkman, H. (1996) Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes, *Blood Journal*, 87(4), 1595-1599.
29. Shahidi, F. (1996). Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, AOCS Press, *Champaign, Illinois*, 0-935315-77-2.
30. Sen, S., and Chakraborty, R. (2011) The role of antioxidants in human health, *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy, Chapter 1*, 1-5.
31. Akkuş I, Kalak S, Vural H, Çağlayan O, Menekşe E, Can G, Durmuş B: Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 244:221- 227, (1996).
32. Jialal, I., and Grundy SM, (1993) Effect of combined supplementation with alphotocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation, *Circulation*. 88: 2780-2786.
33. Burton, G. W. & Ingold, K. U. (1984) *Å- Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science* 224: 569-573.
34. Krinsky, N.I. and Deneke, S.M. (1982) Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids, *Journal of the National Cancer Institute*, 69, 205–209.
35. Gerald F. and Combs, Jr., James, P., McClung, Ph.D. (2017) *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health* 612, 117.
36. Halliwell, B., and Gutteridge J.M.C. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine *Clarendon Press*, Oxford, 543.
37. Buettner, G.R., and Jurkiewicz, B.A. (1996) Catalytic, ascorbate and free a. radicals: Combinations to avoid, *Radiation Research*, 145(5), 532-541.

38. Van-Der Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J., and Faulkner, J.A. (1997) The rol of vitamin E, *Journal Applied Physiology*, 83, 817-823.
39. Frankel, E.N. (1980) Lipid oxidation, A review, *Progress in Lipid Research*, 19, 1-22.
40. Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Haan, L., Spenkeink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Zanden, J.J., Woude, H., Alnk, G.M., and Koeman, J.H. (2002) The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 321–333.
41. Mitchel, R.E.J., and Mccann, R., (1993) Vitamin E is a complete tumor promotor in mouse skin, *Carcinogenesis*, 14(4), 659-662.
42. Kopsell, D.A. and Kopsell, D.E. (2006). Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends In Plant Sciences*, 11; 499-507.
43. Gök, V. ve Serteser, A. (2003) Doğal antioksidanların biyoyararlılığı, 3. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 2-4 Ekim, Ankara.
44. Anıl, M. (2006) Antioksidan olarak tahıllar, *Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, 7-8 Eylül, Gaziantep.
45. Von Elbe, J.H. and Schwartz, S.J. *Colorants. In: Food Chemistry.,O. R. Fennema (ed), Marcel Dekker*, pp. 651-765, New York. (1996).
46. Burton, G.W. (1989) Antioxidant action of carotenoids, *Journal of Nutrition*, 119, 109-111.
47. Paolini, M., Cantelli-Forti, G., Perocco, P., Pedulli, G.F., Abdel-Rahman, S.Z. and Legator, M.S. (1999) Co-carcinogenic effect of β -carotene *Nature*, 398; 760761.
48. Coşkun, F. (2006) Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 27-33.
49. Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: *Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*, *Food Chemistry*, 99, 191-203.
50. Stevenson, D.E., and Hurst, R.D. (2007) Polyphenolic phytochemicals just antioxidants or much more, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2900-2916.

51. Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
52. Feredioon, S. and Janitha, P.K. (1992) Wanasundara, P.D., Phenolic Antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
53. Robards, K., Antolovich, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst*, 122: 11R–34R. (1997).
54. Jung, K.A., Song, T.C., Han, D.S., Kim, I.H., Kim, Y.E., Lee, C.H., Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1782 1785, (2005).
55. Formica, J.V. and Regelson, W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061-1080.
56. Halfon, B. (2005) Natural Products Lecture Notes, *Boğaziçi University Press*, İstanbul.
57. Vining, L.C. (1990) Functions of secondary metabolites, *Annual Review of Microbiology*, 44, 395-427.
58. Saldamlı, İ. (2007) Gıda Kimyası, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 463-492.
59. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Altun, M., Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)- neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC Method, *Free Radical Research*, 39, 949-961. (2005).
60. Bozarı S. (2012) Lamiaceae Familyasına Ait Farklı Türlerden Elde Edilen Allelopatik Potansiyele Sahip Esansiyel Yağların Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum 1-35.
61. Hussain, A. I., (2009) Characterization and Biological Activities of Essential Oils of Some Species of Lamiaceae. pHD, *University of Agriculture, Department of Chemistry*, Pakistan ,10-35.
62. Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L. and Leach, D.N. (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour Fragrance Journal*, 14, 322–332.
63. Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, N.H., and Williamson, G.B. (1993) Just how insoluble are monoterpenes *Journal of Chemical Ecology*, 19, 1799–1807.

64. Breitmaier, E. (2006) Terpenes. Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, WileyVCH, Weinheim, Germany, 220.
65. Dubey, V.S. (2003) Bhalla, R. and Luthra, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants, *Journal of Biosciences*, 28, 637– 646.
66. Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G (2000) Natural products (secondary metabolites), in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Biologists*, Rockville, MD, USA, pp. 1250–1268.
67. Keszei, A., Brubaker, C.L. and Foley, W.J. (2008). A molecular perspective on terpene variation in Australian, *Myrtaceae Australian Journal of Botany*, 1-200.
68. Thormar, H. (2011). Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agent A *John Wiley and Sons, Ltd., Publication*, 205-220
69. Aslan, G. (2010) Tümör immünolojisi, *Turkish Journal of Immunology*, 15, 7-13.
70. Ayaz, H.S., Inceer, H. (2009) Three New *Alchemilla* L. (Rosaceae) Records From Turkey, *Pak J Bot*, 2093, 2096.
71. Güner, A. (2012) Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları*, İstanbul.
72. Wood, M. (1997) The Book of Herbal Wisdom *North Atlantic Books*, Berkeley California.
73. Shrivastava, R., Cucuat, N., John, W.G. (2007) Effects of *Alchemilla vulgaris* and Glycerine on Epithelial and Myofibroblast Cell Growth and Cutaneous Lesion Healing in Rats *Phytother Res*, 369, 373.
74. Hamad, I., Dayı, E.Ö., Pekmez, M., Ucar, O.E., Arda, N. (2007) Free Radical Scavenging Activity and Protective Effects of *Alchemilla vulgaris* L., *J Biotechnol*, 40, 42.
75. Kandemir, A., Sevindi, C., Korkmaz, M. ve Çelikoğlu, Ş. (2015). Erzincan (Türkiye)’a özgü endemik bitki taksonlarının IUCN tehdit kategorileri. *Bağbahçe Bilim Dergisi* 2 (1) 2015: E- ISSN: 2148 -4015.
76. Archana B, Dasgupta N, De B., *In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit*. Food Chemistry, (2005), 90:727–733.

77. Mathew, S., and Abraham, T.E., 2006, Studies on The Antioxidant Activities of Cinnamon (*Cinnamomum Verum*) Bark Extracts, *Through Various in-vitro Models, Food Chemistry*, 94, 520-528.
78. Blois M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical *Nature*. 181, 1199–1200.
79. M Eshtaya, A Ejigu, G Stephens, DA Walsh, GZ Chen, AK Croft An-Najah National University, *Developing energy efficient lignin biomass processing—towards understanding mediator behaviour in ionic liquids*, Faraday discussions 190, 127-145
80. Re, R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 1231-1237.
81. Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., and Almeida, L.M. (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315 (1), 161-169.
82. Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3 144- 158.
83. Zhishen, J., and Mengcheng, T. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry* 64(4), 555-559.
84. Paquat, C., and Hautfenne, A. (1992) International Union of Pure and Applied Chemistry, *Blackwell Scientific Publications*, London.1-50.
85. Freedman, B., Kwolek, W. F., Pryde, E. H. (1986) Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography 1, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 63(10), 1370-1375.
86. Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hossein, A., and Arman. İ. (2015) The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*, *International Journal of Clinical Medicine.*, 6, 635–642.
87. Topal, Y. (2013) *Alchemilla* L. (rosaceae) cinsine ait bazı türlerin fenolik bileşiklerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkisinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Bingöl, 30-64.

88. Zhao, G.R., Xiang, Z.J., Ye, T.X., Yuan, Y.J., and Guo, Z.X. (2006) Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*, *Food Chemistry*, 99, 767-774.
89. Tohidi, B., Rahimmalek, M., and Arzani, A. (2017) Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran *Food Chemistry*, 220, 153–161.
90. Embuscado, M.E. (2015). Spices and herbs: natural sources of antioxidants- a mini review, *Journal of Functional Foods*, 18, 811–819.
91. Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., and Sochor J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries *International Journal of Molecular Science*, 16, 24673–24706.
92. Jonadet M, Meunier MT, Villie F, Bastide JP, Lamaison JL, 1986. *Flavonoids extracted from Ribes nigrum*
93. Hetts, S.W. (1998) To die or not to die, *The Journal of The American Medical Association (JAMA)*, 279, 300-307.
94. Falchero, L., Coppa, M., Fossi, A., Lombardi, G., Ramella, D., Tava, A.: Essential Oil Composition of Lady's Mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) Growing Wild in Alpine Pastures, *Nat Prod Res*, 1367, 1372, (2010)).
95. Büyükgebiz, O. and Caferler, J.S. (2001) Apoptosis, *Sendrom*, 13(1), 102-107.
96. Eichhorst, S.T. and Krammer P.H. (2001) Derangement of apoptosis in cancer, *The Lancet*, 358, 345-346.
97. Mazzio, E.A, Soliman, F.K.: In vitro Screening for the Tumoricidal Properties of International Medicinal Herbs, *Phytotherapy Res*, 385, 398 (2009).
98. Türk, M., Kaya, B., Menemen, Y., Oğuztüzün, S.: Apoptotic and Necrotic Effects of Plant Extracts Belonging to the Genus *Alchemilla* L. Species on HeLa cells in vitro. *J Med Plants Res*, 4566, 4571 (2013).

