



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GÜMÜŞHANE'DE BULUNAN *ASTRAGALUS MICROCEPHALUS* WİLLD. VE
ASTRAGALUS PLUMOSUS WİLLD. BİTKİLERİNİN OKSİDATİF HASARA
KARŞI KORUYUCU VE ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe ARSLAN

MART 2019
GÜMÜŞHANE

**T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**GÜMÜŞHANE'DE BULUNAN *ASTRAGALUS MICROCEPHALUS* WİLLD. VE
ASTRAGALUS PLUMOSUS WİLLD. BİTKİLERİNİN OKSİDATİF HASARA KARŞI
KORUYUCU VE ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe ARSLAN

**Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
“Biyoteknoloji Anabilim Dalı”**

Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 22.02.2019

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 06.03.2019

MART 2019



KABUL ve ONAY

Doç. Dr. İbrahim TURAN danışmanlığında Ayşe ARSLAN tarafından hazırlanan “GÜMÜŞHANE'DE BULUNAN *ASTRAGALUS MICROCEPHALUS* WILLD. VE *ASTRAGALUS PLUMOSUS* WILLD. BİTKİLERİNİN OKSİDATİF HASARA KARŞI KORUYUCU VE ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ” isimli bu çalışma jürimiz tarafından Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoteknoloji** Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak Oy Birliği ile kabul edilmiştir.

Başkan :Dr. Öğretim Üyesi Kağan KILINÇ

Üye(Danışman) :Doç. Dr. İbrahim TURAN

Üye :Doç. Dr. Selim DEMİR

ONAY

Bu tez 17/04/19 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ferkan ŞİPAHI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:17.F5119.07.01

TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlamış olduğum “Gümüşhane'de Bulunan *Astragalus Microcephalus* Willd. ve *Astragalus Plumosus* Willd. Bitkilerinin Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu ve Antidiyabetik Etkilerinin İncelenmesi” isimli tez çalışmasında; bütün bilgi ve belgeleri genel akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 22/02/2019



Ayşe ARSLAN
İmza

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜMÜŞHANE'DE BULUNAN *ASTRAGALUS MICROCEPHALUS* WİLLD. VE *ASTRAGALUS PLUMOSUS* WİLLD. BİTKİLERİNİN OKSİDATİF HASARA KARŞI KORUYUCU VE ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ayşe ARSLAN

Gümüşhane Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İbrahim TURAN

2019, 77 sayfa

Gümüşhane ilimiz bulunduğu coğrafi konumdan dolayı farklı iklimlerin etkisi altında kalmıştır. Bu durum ilimizin bitki örtüsü bakımından zengin olmasına ve çeşitli *Astragalus* türlerine ev sahipliği yapmasına sebep olmuştur. *Astragalus* cinsi *Fabaceae* familyasına dahil olup *Astragalus* türlerinin antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antidiyabetik, yaşlanmayı geciktirici ve antiviral etkinlikleri belirlenmiştir. Söz konusu bu etkilerinin bitkilerin içeriğinde bulunan fenolik bileşikler ve saponinlerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Bu türlerin yaprak ekstraktlarının, kimyasal ve biyoaktif özellikleri toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerik, demir indirgeyici güç, hemoliz inhibisyonu, α -

glukozidaz inhibisyonu ile serumda oksidatif hasar analizleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlendi. Çalışılan bitki ekstraktlarının en yüksek toplam polifenol içeriği gram örnek başına *Astragalus plumosus*'un etanollü ekstraktında 13.9 mg, *Astragalus microcephalus*'un etanollü ekstraktında ise 14.8 mg gallik asit eşdeğeri olarak bulundu. Bitkilerin en yüksek toplam flavonoid içerikleri gram örnek başına *A. plumosus*'un PBS'li ekstraktında 4.19 mg, *A. microcephalus*'un sulu ekstraktında 6.18 mg kuersetin eşdeğeri olarak bulundu. Bitkilerin en yüksek demir indirgeyici güç aktivitesine gram örnek başına *A. plumosus*'un PBS'li ekstraktında 13 mg, *A. microcephalus*'un sulu ekstraktında 13.8 mg troloks eşdeğeri olarak bulundu. Bitki ekstraktlarının en yüksek DPPH radikalini giderme aktivitesi *A. plumosus*'un sulu ekstraktında %14.6 ve *A. microcephalus*'un PBS'li ekstraktında %19 olarak bulundu. *A. plumosus* ve *A. microcephalus* 25 mg/mL etanol ekstraktlarının en yüksek alfa glukozidaz inhibisyonu *A. plumosus* ekstraktında %39.9 olarak bulundu. *A. plumosus* ve *A. microcephalus* bitkilerinin üç farklı konsantrasyonda hazırlanan PBS'li ekstraktlarındaki en yüksek hemoliz ihhibisyonu değeri *A. plumosus* ekstraktında %97.7 olarak bulundu. *A. plumosus* ve *A. microcephalus* bitkilerinin PBS'li ekstraktlarında TAS değerleri sırasıyla 1.41 ve 1.44 mmol troloks eşdeğeri şeklinde, TOS değerleri 25.8 ve 24.7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri olarak OSİ değerleri ise sırasıyla 1.83 ve 1.71 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L şeklinde verildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda bitki ekstraktlarımızın alfa glukozidaz enzim inhibisyonu ve hemoliz inhibisyonunu sağladığı, serumda oluşturulan oksidatif hasarın bitki ekstraktları tarafından giderildiği sonucuna varıldı. Bu sonuçlar doğrultusunda bitkilerimizin biyoteknoloji alanında alternatif, tamamlayıcı bir ürün olarak oksidatif hasarın sebep olduğu hastalıkların tedavisinde gıda ve ilaç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Alfa glukozidaz inhibisyonu, Antioksidan, *Astragalus plumosus* Willd., *Astragalus microcephalus* Willd, Hemoliz inhibisyonu

ABSTRACT
MASTER'S THESIS

**AN ANALYSIS OF THE ANTI-DIABETIC AND OXIDATIVE DAMAGE
PROTECTIVE EFFECTS OF *ASTRAGALUS MICROCEPHALUS* WILLD. AND
ASTRAGALUS PLUMOSUS WILLD. SPECIES PLANTS AVAILABLE IN
GÜMÜŞHANE**

Ayşe ARSLAN

Gümüşhane University
Institute of Natural Sciences
Department of Bio-Technology

Advisor: Assoc. Prof Dr İbrahim TURAN

2019, 77 pages

Gumushane has been under the influence of various climates due to its geographical location. Such influence has caused the province to be rich in flora and to host various *Astragalus* species. *Astragalus* species belonging to the *Fabaceae* family has anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-diabetic, anti-aging and anti-viral activities which are reported to be arising from the phenolic compounds and the saponins. The chemical and bioactive features, total polyphenolic content, total flavonoid content, ferric reducing power, haemolysis inhibition, alpha glucosidase inhibition and serum oxidative damage analysis of the leaf extracts of the species were determined by using spectrophotometric methods. The highest total polyphenol content of the plant extracts studied was found to be 13.9 mg per

gram sample in the ethanol extract of *Astragalus plumosus* and to be 14.8 mg gallic acid equivalent in the ethanol extract of *Astragalus microcephalus*. The highest total flavonoid content of the plants was found to be 4.19 mg per gram sample in the PBS extract of *A. plumosus* and to be 6.18 mg quercetin equivalent in the aqueous extract of *A. microcephalus*. The highest ferric reducing power activity of the plants was found to be 13 mg per gram sample in the PBS extract of *A. plumosus* and to be 13.8 mg trolox equivalent in the aqueous extract of *A. microcephalus*. The highest DPPH radical scavenging activity of the plant extracts was found to be 14.6% in the aqueous extract of *A. plumosus* and to be 19% in the PBS extract of *A. microcephalus*. The highest alpha glucosidase inhibition of the *A. plumosus* and *A. microcephalus* 25 mg/mL ethanol extracts was found to be 39.9% in *A. plumosus* extract. In PBS extracts of *A. plumosus* and *A. microcephalus* plants prepared in three different concentrations, the highest haemolysis inhibition value was found to be 97.7% in *A. plumosus* extract. In PBS extracts of *A. plumosus* and *A. microcephalus* plants, TAS values were 1.41 and 1.44 mmol trolox equivalent, respectively; TOS values were 25.8 and 24.7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent and OSI values were 1.83 and 1.71 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L, respectively. The study concluded of plant extracts inhibited alpha-glucosidase enzyme and hemolysis and that oxidative damage in serum was eliminated by plant extracts. In the light of these results, it is suggested that our plants can be used as food and medicine in the treatment of diseases caused by oxidative damage as an alternative and complementary product in the field of biotechnology.

Keywords: Alpha glucosidase inhibition, Antioxidant, *Astragalus plumosus* Willd., *Astragalus microcephalus* Willd., Hemolysis inhibition

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmaya maddi destek sağlayan Gümüşhane Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı başta tez danışman hocam Doç.Dr. İbrahim TURAN'a, bitkilerimin tayin edilmesinde bana yardımcı olan Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a , İstatistik analizlerimin yapılmasında yardımcı olan KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Serap Özer YAMAN'a, hemoliz deneyimde değerli zamanını ayırıp bilgilerini paylaşan Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Hüseyin Avni UYDU'ya, Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi Mikrobiyoloji yüksek lisans öğrencisi Merve KARALI'ye, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyoteknoloji yüksek lisans öğrencileri Deniz CANBOLAT ve Osman AKMEŞE'ye, kan alımlarını gerçekleştiren yengem Nursema ARSLAN'a, her zaman destekçim olan sevgili ailem ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe ARSLAN
Gümüşhane

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
TABLolar DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Çalışmanın Amacı	4
1.3. <i>Astragalus</i> L. (Geven)	5
1.3.1. <i>Astragalus</i> L. İçerik	6
1.3.1.1. Saponinler	7
1.3.1.2. Flavonoidler	7
1.3.2. <i>Astragalus</i> 'un Kullanım Alanları	8
1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	11
1.4.1. Serbest Radikaller	11
1.4.2. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	13
1.4.3. Serbest Radikal Türleri	14
1.4.3.1. Süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)	14
1.4.3.2. Hidroksil Radikalleri ($OH^{\cdot}$)	14
1.4.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	15

1.4.4.	Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri	16
1.4.5.	Oksidatif Stres	19
1.4.6.	Antioksidan Savunma Sistemi	20
1.5.	Antioksidanlar	21
1.5.1.	Antioksidanların Sınıflandırılması	21
1.5.1.1.	Endojen Antioksidanlar	21
1.5.1.2.	Eksojen Antioksidanlar	23
1.6.	Diyabet	24
1.6.1.	Diyabet ve Oksidatif Stres	26
1.6.2.	Tıbbi Bitkiler ve Diyabet	27
1.7.	Hemoliz	29
1.7.1.	Eritrositler (Alyuvarlar)	30
1.7.1.1.	Eritrositler ve Oksidatif Stres	31
1.7.1.2.	Eritrositlerde Oksidatif Stresin Oluşması	31
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	33
2.1.	Giriş	33
2.1.1.	Kullanılan Cihaz, Alet, Malzemeler	33
2.2.	Metod	35
2.2.1.	Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması	35
2.2.2.	Bitkilerin Ekstraksiyonu	36
2.2.3.1.	Toplam Polifenol İçerik Tayini	36
2.2.3.2.	Demir (Fe ³⁺) İndirgeyici Güç Tayini	38
2.2.3.3.	DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	40
2.2.3.4.	Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini	41
2.2.4.	Ekstraktlarda Antidiyabetik Etkinin İncelenmesi	43
2.2.4.1.	α -Glukozidaz İnhibisyon Testi	43
2.2.5.	Eritrosit Hemoliz İnhibisyonu	44

2.2.5.1.	Eritrosit Örneklerinin toplanması	44
2.2.5.2.	Eritrosit Paketlerinin Hazırlanması.....	44
2.2.5.3.	Eritrosit Örneklerinin Hasara Uğratılması.....	44
2.2.6.	Serum Oksidan Antioksidan Durum Tayini	47
2.2.7.	İstatiksel Analiz	50
3.	BULGULAR	52
3.1.	Antioksidan Analiz Sonuçları.....	52
3.2.	α -Glukozidaz İnhibisyon Sonuçları	54
3.3.	Hemoliz İnhibisyon Sonuçları	54
3.4.	TAS-TOS Ve OSI Sonuçları	56
4.	TARTIŞMA.....	54
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
6.	KAYNAKLAR.....	65
7.	EKLER	78
	ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Tip 1 ve Tip 2 diyabetin karşılaştırılması.....	26
Tablo 1.2. Kan şekerini etkileyen bitkiler ve fitokimyasal etkileri	29
Tablo 2.1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	33
Tablo 2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
Tablo 2.3. Bitki ekstraktlarında toplam polifenol içerik tayini için yapılan pipetlemeler...	37
Tablo 2.4. Bitki ekstraktlarında demir indirgeyici güç tayini için yapılan pipetlemeler.....	39
Tablo 2.5. Bitki ekstraktlarında DPPH tayini için yapılan pipetlemeler	40
Tablo 2.6. Bitki ekstraktlarında toplam flavanoid tayini için yapılan pipetlemeler	42
Tablo 2.7. α -glukozidaz testi için yapılan pipetlemeler	43
Tablo 2.8. Hemoliz inhibisyonu için yapılan pipetlemeler	46
Tablo 2.9. TAS ve TOS için oluşturulan deney grupları.....	48
Tablo 3.1. <i>Astragalus plumosus</i> bitki ekstraktı antioksidan analiz sonuçları.....	52
Tablo 3.2. <i>Astragalus plumosus</i> bitki ekstraktına ait DPPH sonuçları.....	52
Tablo 3.3. <i>Astragalus microcephalus</i> bitki ekstraktı analiz sonuçları.....	53
Tablo 3.4. <i>Astragalus microcephalus</i> bitki ekstraktına ait DPPH sonuçları	53
Tablo 3.5. TAS, TOS, OSI değerleri	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Gümüşhane Çamlıköy Olukdere mevkiinde bulunan <i>Astragalus plumosus</i> bitkisine ait görüntü	5
Şekil 1.2. Reaktif oksijen türlerini oluşturan bazı durumlar	17
Şekil 1.3. Hücre ve dokularda ROS etkisi	18
Şekil 1.4. Oksidatif Stres	19
Şekil 1.5. Antioksidan savunma sistemi	20
Şekil 2.1. <i>Astragalus plumosus</i>	35
Şekil 2.2. <i>Astragalus microcephalus</i>	35
Şekil 2.3. Gallik asit standart grafiği	37
Şekil 2.4. Demir indirgeyici güç troloks standart grafiği	39
Şekil 2.5. DPPH troloks standart grafiği	41
Şekil 2.6. Kuersetin standart grafiği	42
Şekil 2.7. t-BHP'nin açık formülü	45
Şekil 4.1. α -glukozidaz %inhibisyon	54
Şekil 3.2. <i>Astragalus microcephalus</i> ekstraktında % hemoliz inhibisyonu	55
Şekil 3.3. <i>Astragalus plumosus</i> ekstraktında % hemoliz inhibisyonu	55

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

A.m	: <i>Astragalus microcephalus</i>
A.p	: <i>Astragalus plumosus</i>
AAPH	: 2,2 azobis (2 amidinopropan) dihidroklorit
Al (NO ₃) ₃	: Alimunyum nitrat
CAT	: Katalaz
DM	: Diabetes mellitus
DPPH	: 2,2 difenil1 pikrihidrazil
FeCl ₃	: Demir (III) klorür
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HClO	: Hipokloröz asit
K ₃ F(CN) ₆	: Potasyum ferrisiyanid
KCH ₃ COO	: Potasyum asetat
LPO	: Lipid peroksidasyonu
NO [•]	: Nitrik oksit
O [•]	: Süperoksit radikali
OH [•]	: Hidroksil radikali
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Fosfat tamponu
p-NPG	: p nitrofenil α -glukopiranozit
RCOO	: Organik hidroksiperoksitler
ROO	: Peroksil radikalleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RS [•]	: Tiyol
SOD	: Süperoksit dismutaz
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
STZ	: Streptozotosin
TAS	: Toplam antioksidan kapasite
t-BHP/tBOOH	: Tersiyer bütıl hidroksiperoksit
TOS	: Toplam oksidan kapasite
WHO	: Dünya sağlık örgütü

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller ve bu serbest radikallere karşı oluşturulan süpürücü etkiye sahip antioksidanlar vardır. Serbest radikaller ve antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olup bu dengenin bozulmasına oksidatif stres denir (Özen vd., 2015). Radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi önemli hücresel bileşenlere zarar verir (Kopani vd., 2005).

Mitokondri organelinde üretilen reaktif oksijen türleri (ROS); hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gibi kısa ömürlü moleküllerdir. Bunların yanı sıra nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) ve peroksil radikalleri ($\text{ROO}^\cdot$) de reaktif oksijen türlerindendir (Babior, 2000). Reaktif oksijen türleri (ROS) oldukça yüksek reaktiviteye sahiptir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve $\text{OH}^\cdot$ radikalleri yüksek derecede reaktif oksidanlardır ve bu reaktif oksidanlar dış yörüngelerinde paylaşılmamış bir elektron bulundurlar. H_2O_2 hücreler için toksik bir moleküldür. Bu molekül $\text{OH}^\cdot$ radikalini oluşturarak serbest radikal üretimine neden olmaktadır. Ortalama bir insan hücresinde her saat yaklaşık olarak 3×10^9 toksik H_2O_2 molekülü üretilir (Wickens, 2001).

Hidroksil radikali, lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal olup, hücrenin membran yapısında ve bütünlüğünde bozulmalara sebep olmaktadır. Serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine etki etmesi ve oluşan son ürünlerin hücrelerde toksik etki oluşturarak hücre hasarına sebep olması lipid peroksidasyonunun bir sonucudur (Ersoy ve Dilek, 1999).

Hidrojen peroksit molekülünün eritrositlerde meydana getirdiği oksidasyon sonucunda, bu molekülün eritrositlerde hemolize ve membran hasarına neden olduğu bilinmektedir. Çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. Antioksidan enzimlerin etkisi sonucunda, hücre reaktif oksijen ürünlerinin sebep olduğu oksidatif hasardan korunur. Bu durumda antioksidan enzimler hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında başlıca rol oynarlar (Dülger vd., 2002).

Serbest radikaller; normal metabolizmanın bir sonucu olarak veya yüksek oksijen basıncı, yaşlanma, radyasyon, iskemi-reperfüzyon, kimyasal ajanlara maruz kalma ve inflamasyon gibi sebeplere bağlı olarak üretilirler (Özcan vd., 2015). Hücrelerde serbest radikallerin artması

birçok hastalığa neden olmaktadır. Kanser, diyabet, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıkların ve yaşlanmanın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Engin ve Altan, 2000).

Tüm dünyada sık rastlanılan hastalıklar arasında diyabet yer almaktadır. Diyabetten ölen insan sayısı gün geçtikçe çoğalmaktadır. 2010 yılı verilerine göre ülkemizde diyabetten yılda ortalama 33832 kişi yaşamını yitirmiştir (Akyurt, 2014).

Uzun yıllardan beri diyabet tedavisinde bitkisel ilaçlardan faydalanılmaktadır. Dünya üzerinde bitkilerle yapılan çalışmalarda bu bitkilerin 800 türünün kan şekerini düşürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Alarcon-Aguilara vd., 1998; Perez, R.M. vd., 1984; Grover vd., 2002). Günümüzde kullanılan bu bitkilerin antidiyabetik etki gösteren birçok sekonder metabolitleri tespit edilmiştir. Bunlar, alkaloidler, glikozidler, terpenoidler, steroidler, fenolikler ve saponinler gibi metabolitlerdir (Grover vd., 2002). Diyabet tedavisinde kullanılan birçok bitki kan glukoz seviyesini düşürerek antidiyabetik etki göstermektedir. Birçok bitki polifenolünün karbohidrat yıkımında görev alan alfa glukozidaz(α -glukozidaz) enzimini inhibe etme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin dutta, yeşil çayda, patatesta α -glukozidazı inhibe eden fenolik bileşikler tespit edilmiştir (Mai vd., 2007).

α -glukozidaz enzimleri ince bağırsağın mikrovillus denilen fırçası yüzeyinde bulunurlar. Bu enzimler polisakkaritlerin parçalanmasından sorumlu olup oligo ve disakkaridleri monosakkaridlere kadar yıkarak, monosakkaridlerin bağırsak duvarından kolayca emilip kana geçmesini sağlarlar. α -glukozidaz enzim inhibitörleri ise bu enzimleri yarışmalı olarak inhibe eder (Mai vd., 2007).

Deneyisel çalışmalarda diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabet hastalığı olan insanlarda serbest oksijen radikallerinde ve lipid peroksidasyonunda önemli derecede bir artış olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda oksidatif stresin diyabete neden olduğu ve diyabetin ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmektedir (Pitkanen vd., 1992). Diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkması antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin ve uzamış oksidatif stresin bu komplikasyonlardan kaynaklanabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Altan vd., 2006). Oksidatif hasarın neden olduğu hastalıkların tedavisinde doğal antioksidanlar en önemli kaynak olarak gösterilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Sentetik antioksidanlar hücrelerde olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu durumun ortaya çıkması araştırmacıları doğal ürün kaynaklı antioksidanlara

yönelmiştir. Doğal ürün kökenli antioksidanlar olarak bitkilerden izole edilen, karotenoidler, azotlu bileşikler (alkaloid, aminoasit ve aminler), fenoller (flavonoid), tokoferol ve askorbik asit kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların kanser gibi hastalıkları tetikleyerek insan sağlığını tehlikeye sokabileceği şüphesinden dolayı, bitkiler sentetik antioksidanlar yerine alternatif antioksidan madde araştırmaları için önemli kaynak oluşturmaktadır (Velioğlu vd., 1998).

Ülkemizin sahip olduğu topoğrafik yapılar, toprak grupları, coğrafi konumu ve jeolojik yapısı, değişik iklim tiplerinin etkisi altında kalmasına neden olmaktadır. Ülkemiz üç farklı bitki coğrafyası bölgesinin birleştiği yerde olup bazı İran-Turan asıllı bitki cinslerinin gen merkezidir. Bu ekolojik ve floristik nedenlerle ülkemiz zengin bir bitki topluluğu ile çok değişik vejetasyon tiplerine sahiptir. Türkiye’de ‘‘Flora of Turkey and The East Aegean Islands’’ ‘a göre 174 familya içerisinde 1251 cins ve 12000 ‘den fazla tür ve tür altı takson vardır. Bu durum ülkemizin oldukça zengin bir floraya sahip olduğunu gösterir (Davis, 1965 -1985; Davis vd.,1988; Güner vd.,2000). Yurdumuzda bu taksonların içerisinde 234’ü kültür bitkilerini ve yabancı kaynaklı bitkileri, geriye kalan türleri ise doğal olarak yayılış gösteren bitkileri oluşturmaktadır (Ekim vd., 1989; Erik ve Tarıkahya, 2004).

Avrupa kıtasının tümü yaklaşık olarak 12000’den fazla bitki taksonuna sahip olup, Türkiye ile bitki örtüsü açısından karşılaştırıldığında yurdumuzun bitki örtüsü bakımından çok zengin olduğu görülmektedir. Avrupa ülkelerinde endemik olarak bulunan bitki topluluğu sayısı yaklaşık 2750 iken Türkiye’de ise bu sayı 2891’dir. Bu sayıya 497 alt türü 390 varyetiyi dahil ettiğimizde toplam endemik takson sayısı 3750’den fazladır. Endemizm oranı bakımından tüm Avrupa ülkeleri ile kıyaslama yapıldığında yurdumuz endemizm bakımından da oldukça zengindir (Güner vd., 2000; Ekim vd., 2000). Ülkemizin bu zengin bitki çeşitliliğinden nasibini almış Gümüşhane ilimiz, Türkiye’de Doğu Karadeniz bölgesinin iç kesimlerinde bulunur. Doğu Anadolu ile Karadeniz bölgesi arasında olup geçiş ikliminin özelliklerini göstermektedir. Her iki iklimin özelliğini göstermesine karşın birbirine yakın kesimlerde bile büyük farklılıklar olup yazları serin, kışları soğuk bir iklim görülür Yeryüzü şekilleri bakımından il tamamen dağlarla kuşatılmıştır. Güney kesimi yüksek plato özelliği gösterip, kuzey kesimi ise engebelerdir. İlimizin sahip olduğu coğrafi özellikler ve geçiş iklimi özellikleri bitki örtüsü bakımından zengin olmasını sağlamıştır (Okçu., 2012).

Baklagiller familyası olan *Fabaceae* familyasında yer alan *Astragalus* (geven) kurak ve yarı kurak bölgelerde yayılış göstermektedir. Türkiye’de bu cinse ait türler orman, step

ve dağ yamaçlarında yayılış göstermekte olup; Doğu ve İç Anadolu bölgesinde 1300-3500 metre, İç Ege ve Toroslar'da ise 1300-2300 metre yükseltilerde görülmektedir (Akan vd., 2007). *Astragalus* çok geniş yayılış gösteren bir cins olup 425 takson ile yaklaşık 2500 türü olan ülkemizin sahip olduğu bu zengin flora içerisindeki en zengin cinstir (Davis, 1970; Maassoumi, 1998; Güner vd, 2000; Ekici vd., 2008). *Astragalus* türleri bal özü olarak arıcılıkta, hayvan yemi olarak hayvancılıkta, gıda, kozmetik, tekstil, kalem, kibrit ve deri sanayisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Kadıoğlu vd., 2008). *Astragalus gummifer* türü Gümüşhane ili merkez ilçe köyleri florasında yoğun olarak bulunup arıcılıkta kullanılmaktadır (Çöçen vd., 2014). Birçok *Astragalus* türü karaciğer koruyucu, antioksidan, immüностimülan ve antiviral farmakolojik etkilere sahiptir. Bu farmakolojik etkilerin üç grup kimyasaldan kaynaklandığı saptanmıştır. Bunlar poliholozitler, saponinler ve fenoliklerdir (Rios ve Waterman, 1997). Bu kadar farmakolojik özelliğe sahip olması ile dünyada yapılan çalışmaların *Astragalus* cinsine ait birçok türün kullanım alanlarından en önemlisinin tıp alanı olduğu belirtilmektedir. Avrupa ülkelerinde *Astragalus* türlerinin birçoğu tıbbi bitki olarak kullanılmakta, bu türlerin insan sağlığına etkileri çok eskiden beri bilinmekte ve bazı *Astragalus* türlerinin sulu köklerinden elde edilen ekstraktı Türk halkı tarafından lösemi tedavisinde ve yaraların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Yeşilada vd., 2004). Çobanlar *Astragalus* bitkisini yakacak olarak kullanması sırasında dumanın soğuk algınlığına iyi geldiğini tespit etmişlerdir (Kadıoğlu vd., 2008). *Astragalus* türleri ile yapılan sonraki araştırmalarda bu türlerin bağışıklığı güçlendirdiği ve kalbin kan pompalama hacminde (kalp debisi) iyileştirmeler sağladığı, karaciğerde oluşan hücre hasarına karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra fareler üzerine yapılan araştırmalarda ise *Astragalus* özü kullanılan farelerde idrar torbası kanserinde azalma görüldüğü ve akciğer kanseri hastalarında tümör gelişimini durdurduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2017; Xu vd., 2018).

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, Gümüşhane'de yetişen *Astragalus microcephalus* Willd. (Anadolu kitresi) ve *Astragalus plumosus* Willd. (tavşan topağı) türlerinin biyolojik sistemlerde oksidatif hasar onarıcı ve/veya önleyici ve diyabet üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Tez çalışmasının sonunda bu ürünlerin ülkemizin son yıllarda koyduğu stratejik hedeflerden biri olan yerli ilaç geliştirilmesi projelerine katkı sağlayacağı, ayrıca

sonuçların literatürdeki boşluğu doldurma açısından önemli olacağı ve bu yönüyle de biyoteknoloji alanındaki yeni projelere öncülük edeceği düşünülmektedir.

1.3. *Astragalus* L. (Geven)



Şekil 1.1. Gümüşhane Çamlıköy Olukdere mevkiinde bulunan *Astragalus plumosus* bitkisine ait görüntü

Ülkemiz flora bakımından zengin bir ülke olup, bulunduğu coğrafi konum, jeolojik yapı, topoğrafik yapı ve farklı toprak grupları içeriyor olması, değişik iklim tiplerinin etkisinde olması, bunların yanı sıra İran-Turan asıllı bitki cinslerinin gen merkezi olması nedeniyle çok değişik vejetasyon tiplerine ev sahipliği yapmaktadır (Davis, 1970; Ekici vd., 2008; Güner vd., 2008; Aytaç ve Erkul, 2013). İran-Turan kökenli bitki cinslerinden biri de *Fabaceae* familyasına ait olan *Astragalus* L. cinsidir. *Leguminoasea* veya bakla ailesi denilen *Fabaceae* tarımsal ve ekonomik açıdan buğdaygillerden sonra en büyük ikinci familyadır. Bu familya 727 cins ve yaklaşık 19500 tür içermektedir (Lewis vd., 2005). Ülkemizde *Fabaceae* familyasına ait 61 cins ve bu familyaya ait 900'den fazla tür bulunmaktadır. Bu familyanın üyeleri insanlar tarafından sıvı yağlar, lif, yakıt, gübre, kereste, tedavi edici kimyasal maddeler ve bahçecilik işleri gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra insanlar ve hayvanlar için gıda maddesi özelliği taşıyan önemli türleri de vardır. Bazı türleri ilaç bazı türleri ise süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Seçmen vd., 2004).

Fabaceae familyasında yer alan birçok tür içerisinde bulundurduğu izoflavonlar sayesinde kanser riskini azaltmakta aynı zamanda kolestrolü de düşürmektedir (Graham ve Vance, 2003). *Fabaceae* familyasına ait olan *Astragalus* L. cinsi dünyada yaklaşık 3000 takson ile, ülkemizde ise 463 takson ile en zengin bitki topluluğuna sahip olup takson sayısı bakımından 1.sırada yer almaktadır. Bu taksonlardan 21'i endemik olup, endemizm oranı %47'lerdedir (Davis, 1970; Ekici, vd., 2008; Güner vd., 2008; Aytaç ve Erkul, 2013).

Dünyada *Astragalus*'un yayılış gösterdiği bölgeler arasında Kuzey Amerika, Avrasya ve Güney Amerika gibi kurak ve yarı kurak bölgeler vardır. En fazla türün olduğu bölgeler Güneybatı Asya'da 1000-1500 tür, Orta Asya'da bulunan Sino-Himalaya bölgesinde 500 tür, Güney Amerika'da 400-450 tür ve Kuzey Amerika'da And dağları boyunca 100 tür yayılış göstermektedir Türkiye'de ise bu cinse ait türler orman, step ve dağ yamaçlarında yayılış göstermekte olup, Doğu ve İç Anadolu bölgesinde 1300-3500 metre, İç Ege ve Toroslar'da ise 1300-2300 metre yükseltilerde görülmektedir (Arslan, 2010).

1.3.1. *Astragalus* L. İçerik

Astragalus'un temel aktif bileşenleri saponinler, flavonoidler ve polisakkaritlerdir. Ayrıca antrakınonlar, aminoasitler, P-sitositerol ve metalik elementler gibi bileşenleri de içermektedir (Li vd., 2014). Bugüne kadar 100'den fazla *Astragalus* içeren bileşik tanımlanmıştır. (Tian vd., 2016) *Astragalus* türlerinden biri olan *Radix astragali*'nin aktif bileşeni olarak astragaloside IV tespit edilmiştir. Bu aktif bileşiğin antioksidan özelliğe sahip olduğu, reaktif oksijen türlerini temizleyerek ve lipid peroksidasyonunu azaltarak hepatik stellat hücrelerinde oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. *Astragalus orbiculatus* Ledeb'de sikloorbicoside G ve A. *sieversianus* Pall'de siklosieversiosid A gibi sikloartan glikozitlerinin, lipidlerin peroksidasyonunu inhibe ettiği, antioksidan ve NO-ergic sistemleri stabilize etme yönünde katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *Astragalus corniculatus*'tan elde edilen bir saponin karışımının hem karaciğer mikrozomlarında hem de spontan hipertansif sıçan-suşu Okamoto Aoki'den ve normotensif Wistar sıçanlarında (NTR'ler) antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Denizli vd., 2014).

1.3.1.1. Saponinler

Saponinler *Astragalus* cinsinin başlıca kimyasal bileşeni olup *Astragalus* türlerine ait 152 tip sikloartan tanımlanmıştır. Sikloartan triterpenoidler ilk defa *Astragalus* bitkilerinde ortaya çıkarılmıştır (Mamedova ve Isaev, 2004). *Astragalus* türlerinden elde edilen sikloartan ve oleanan tipi glikozitler, anti-protozoal, imünostimüle, antiviral ve sitotoksik aktivitelerde dahil olmak üzere ilginç biyolojik özellikler göstermiştir (Gulcemal vd., 2011).

Türkiye'nin endemik türlerinden olan *Astragalus plumosus* var. *Krugianus* üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda bu bitkinin metanollü ekstraktında 15 bilinen sikloartan ile birlikte krugianoside A (1) olarak adlandırılan yeni bir sikloartan tipi bir saponin tespit edilmiştir (Denizli vd., 2014). *Astragalus* cinsi bitkilerinin kardiyotonik, hipokolesteremik, anti-depresif ve antiblastik etki ve immünomodülatör aktiviteye sahip olmalarının kaynağı sikloartan tipi saponin olduğu kanıtlanmıştır (Li vd., 2014). Ayrıca Çin tıbbında yüzyıllardır tıbbi bitki olarak kullanılan *Astragalus* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda diüretik ve tonik gibi etkilerinin sikloartan tipi saponinler ve polisakkaritlerin sorumlu olduğu ortaya koyulmuştur. Şimdiye kadar 140'dan fazla sikloartan tipi saponin tanımlanmıştır (Rios ve Waterman 1997; Tang ve Eisenbrand, 1992).

1.3.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, önemli antioksidan ve şelatlama özellikleri olan büyük bir fenolik bitki kimyasal grubudur. Bunlar, tohumlar, meyveler, sebzeler, kabuk, yapraklar ve çiçekler içerisinde yaygın olarak bulunurlar. Biyoaktif potansiyelleri bir süredir tanınmasına rağmen, biyoyararlanımı, sağlık etkileri ve metabolik akıbeti ile ilgili veriler sadece son yirmi yılda ortaya çıkmıştır. Antioksidan özelliklerinin yanı sıra, flavanoidlerin çoklu biyolojik özellikler sergiledikleri bildirilmiştir. Flavonoidlerin antikanser (prostat, meme, kolon ve akciğerler), kardiyatik koruma (başlıca ateros koruma) antiviral, anti-enflamutuar, yaşlanmayı geciktirici ve anti-nörodejeneratif Alzheimer hastalığına karşı etkileri vardır (Ebegboni vd., 2019).

Aromatik halka yapılarına sahiptirler. Bu halka yapılarındaki hidroksil grubundan dolayı hidrojen vererek redoks tepkimelerine girer ve serbest radikalleri yok edebilirler. Ayrıca bazı grupları metal şelatlama kapasitesine sahip olup birtakım reaktif oksijen türlerinin (hidroksil ve süperoksit) oluşumunu önleyebilirler (Naczki ve Shahidi, 2004).

Flavonoidler antioksidan aktivitelerini sindirim kanalında gösterirler. Lipidler, proteinler ve karbohidratları sindirim esnasında oksidatif hasardan korur ve böylece E ve C vitamini gibi çözülebilir antioksidanların tükenmesini engeller (Bravo, 1998).

Bitki fenollerinde en gelişmiş ve en çok çalışılmış grupturlar. Günümüzde 4000'den fazla flavonoid belirlenmiştir (Lin ve Jin Tang, 2007). Diğer birçok bitki gibi, *Astragalus* cinsi bitkileri de zengin bir flavonoid kaynağıdır (Li vd., 2014). Özellikle izoflavonlar, izoflavanlar, pterocarpanlar, flavonoller, flavonlar ve flavononlar dahil olmak üzere 63'den fazla flavonoid vardır. Bunların arasında izoflavonlar en önemli bileşenlerdir ve izoflavonlardan biri olan kalikozin-7-O- β -D-glukozit dominant bileşendir ve *Astragalus membranaceus*'un kalite analizinde kimyasal bir belirteç olarak kullanılmıştır. Buna ek olarak, sülfüretin, isoliquiritigenin ve pendulone dahil olmak üzere 3 özel flavonoid vardır (Liu vd., 2017).

1.3.2. *Astragalus*'un Kullanım Alanları

Astragalus türleri uzun yıllardan beri halk arasında birçok alanda kullanılmaktadır. Bu türlerin bazıları uzun ve yaygın kök sistemine sahip olup erozyonu önlemede, bazı türleri ise dikensiz ve gösterişli çiçeklere sahip olup süs bitkisi olarak, birçok türü ise fazla miktarda bal özü salgısına sahip olmasından dolayı arıcılıkta kullanılmaktadır. *Astragalus* türlerinin kökleri 3-5 m kadar derine inebilebilir ve geniş dalları ile eğimli arazilerde erozyonun oluşmasını önler. Bu türler yayıldıkları alanın 2-4 katı büyüklüğündeki arazileri kaymalara karşı da korumaktadır. Ahtapot gibi uzanan kökleri çaprazlama toprağı korurken, toprağın içinde gelişen zayıf bitkileri de dikenleri sayesinde hayvanlara karşı korumaktadır. *Astragalus* türlerinin gövdelerinden açılan çizikle veya gövdelerindeki çatlaklardan ortaya çıkan öz suya kitre denir (Kadioğlu vd., 2008). Kitre yapışkan bir özelliğe sahip olup asırlardan beri geleneksel tıpta yatıştırıcı ve ishal önleyici olarak kullanılmıştır. Kitrenin tıpta kullanımının yanı sıra yapışkan, emülsifiye edici, sıkılaştırıcı ve katılaştırıcı ajan olarak diş hekimliğinde protez yapımında, bunların yanı sıra tekstil endüstrisinde ve gıda endüstrisinde özellikle dondurma yapımında kullanılmaktadır. Ekonomik açıdan önemli dereceye sahip kitre zımkı *A. aureus* Willd., *A. brachycalyx* Fischer ve *A. microcephalus* Willd. türlerinden elde edilmektedir (Uysal, 1997).

Doğu Asya'da yetişen *Astragalus* türlerinin kurutulmuş kökleri geleneksel Çin tıbbında ter önleyici, diüretik ve tonik olarak, emboli, nefrit, diyabet, hipertansiyon, siroz, lösemi ve rahim kanseri gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin

Çin tıbbında kullanılan *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao'un (Radix Astragali) kökü, retiküendotelyal sistem hücrelerinin fagositozunu kuvvetlendiren, hipofiz-adrenal kortikal aktiviteyi uyaran, kemik iliğinde tükenmiş kırmızı kan hücrelerinin yeniden oluşumunu sağlayan özelliklere sahip çok değerli bir ilaçtır (Li vd., 2014).

Asya'daki bazı *Astragalus* türlerinin doğal ürün kaynağı kitre olup ekonomik açıdan önemli bir yere sahiptir (Li vd., 2014). İlaç sanayinde ve ekonomide oldukça geniş bir alana sahip olan kitrenin ülkemizdeki başlıca türleri *A. gummifer* (Türk kitresi) ve *A. microcephalus* (Anadolu kitresi)'dur (Seçmen vd., 2004).

Kuzey Çin, Moğolistan ve Kore'de yetişen *Astragalus membranaceus*'un *Astragali Radix* veya *Huangqi* olarak adlandırılan kurutulmuş kökleri dünya çapında kullanılan şifalı bitkilerdendir. *Astragalus membranaceus* Çin tıbbında iki bin yıldan fazla bir süredir geleneksel olarak kullanılmakta ve idrara çıkmayı kolaylaştırdığı, pürülan akıntısını azalttığı ve yumuşak doku onarımını desteklediği düşünülmektedir. Bugüne kadar *A. membranaceus*'un sulu ekstraktı çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bu durum hala devam etmekte ve yorgunluk, anoreksi, anemi, ateş, alerji, mide ülseri ve ishal dahil olmak üzere çeşitli durumların alternatif tedavisi için uygulanmaktadır (Wu vd., 2018). Tıbbi amaçlı en yaygın olarak kullanılan türler *A. membranaceus*, *A. trigonus* ve *A. gummifer*'dir (Kathi vd., 1999). *Astragalus membranaceus* kökü ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilen saponinlerin lösemi ve meme kanserine karşı etkili olduğu saptanmıştır (Ionkova vd., 2010). *Astragalus* kökü için başlıca klinik kullanım, viral hastalıkları önlemek için bir immünomodülatördür; ayrıca kanser, HIV ve atopik hastalıklar için yardımcı bir tedavi olarak kullanılır. Çin tıbbında geleneksel olarak iştah azalması, viral enfeksiyonlarda duyarlılık, iyileşmeyen yaralar, terleme, uterus kanaması, ödem (nefrit), uyuşukluk, kas ağrısı, diyabet ve uterus, rahim veya kolon kanseri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kathi vd., 1999).

Astragalus (geven) türleri halk arasında antioksidan, karaciğer koruyucu, immunostimülan ve antiviral özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Gripe karşı bağışıklık sistemini güçlendirerek antikör üretimini ve bunların hastalıklarla savaş kabiliyetini artırmaktadır. Sadece gribe karşı dayanıklılığı artırmakla kalmayıp aynı zamanda hastalığın süresini de kısaltmaktadır. Bu farmakolojik etkilerin oluşmasını sağlayan kimyasal maddelerin poliholozitler, saponinler ve fenolikler olduğu saptanmıştır (Rios ve Waterman, 1997). Bu kimyasal maddelerin yanı sıra *Astragalus* türlerinde sıkça bulunan

sekonder metabolitler triterpenoitlerdir; oleanan, lanostan ve sikloartan tip triterpenoidlerin varlığı yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur (Isaev vd., 2007; Li vd., 2014).

Krugianoside A'nın tersiyel- bütül hidroksi peroksit (t-BOOH) tarafından indüklenen ROS'un oluşumunu engellediği ve bunun yanı sıra bu bileşiğin potansiyel aktivitesinin fibroblastları oksidatif strese karşı koruduğu öne sürülmüştür (Yusufoğlu vd., 2014). *Astragalus* saponinleri üzerine yapılan kimyasal çalışmalarda elde edilen anti-inflamatuar, idrar söktürücü, tansiyon düşürücü gibi biyolojik etkilerin sikloartan tip triterpenoidlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Bedir vd., 2000). Yapılan farklı bir çalışmada *A. chrysochlorus*'un kök ekstraktının sitotoksik, antioksidan ve fagositik etkileri belirlenmiştir (Hasançebi, 2003).

Astragalus kökleri eskiden beri idrar söktürücü, ter önleyici ve canlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra şeker hastalığı böbrek iltihabı, kan kanseri ve rahim kanseri tedavilerinde de kullanılmaktadır. Türkiye'de Güneydoğu Anadolu Bölgesinde *Astragalus* köklerinden elde edilen sıvı ekstraktı yara iyileştirici ve lösemi tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (Bedir vd., 2000).

Uzun yıllardan beri insanlar tıbbi özelliklerini bildikleri bitkilerin dumanlarını tedavi amaçlı olarak kullanmıştır. İran'da anzarut olarak adlandırılan *A. fasciculifolius* bitkisinin kök kısmından elde edilen reçinenin kulak hastalıkları tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir. Çin'de yetişen bazı bitkilerin kemoterapi etkinliğini artırdığı ve toksisiteyi düşürdüğü belirtilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda özellikle *Astragalus*'un makrofaj ve doğal katil hücre aktivitesini uyarak ve T yardımcı tip 2 sitokinleri inhibe ederek immünolojik olarak faydaları olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *Astragalus* temelli bitkisel ilaçlar ile platinyum temelli kemoterapi birlikte kullanılmış ve başarı oranı, tümör cevabı ve kemoterapinin toksik etkisi incelenmiş ve sonuç olarak bu bitki türünün kemoterapinin verimini artırdığı belirtilmiştir (Mohagheghzadeh vd., 2006).

A. membranaceus Doğu tıbbında yaygın bir kullanıma sahiptir. Bitkinin kök özütlerinin bağışıklık sistemini güçlendirici ve dolaşımı düzenleyici etkilerinin olduğunu, mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz aktivasyonunu sağladığını ve bu etkisiyle iltihap giderici potansiyel bir aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Ryu vd., 2008). *Astragalus membranaceus* Asya ülkelerinde geleneksel tıpta yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu türün köklerinden elde edilen özütlerinden otoimmün bir reaksiyon sonucu ortaya çıkan akut kalp kası hastalığı için deneysel bir model geliştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada kalp kası hücrelerinde gözlemlenen bozulmalara, kalbin yenilenmesine ve morfolojik başkalaşım

göstermesi üzerine olan etkilerine bakılmıştır (Yan vd., 2009). Otoimmün miyokardit'te *Astragalus* köklerinden elde edilen özütleri deney farelerinin damar içine üç hafta boyunca verilmesi sonucunda elde edilen bulgulardan biri farelerdeki lenfosit üretiminin arttığı, diğeri ise Th2 sitokinlerinin (IL-4 ve IL-10) seviyesini artırdığını bunlara bağlı olarak kalbi koruduğunu bildirmişlerdir (McCulloch vd., 2006).

A. mongholicus türü ile ilgili yapılan bir çalışmada bitkinin köklerinden afinite kromatografisi yöntemiyle özütledikleri ve saflaştırdıkları bir lektin (AMML) molekülünün insanda rahim ağzı kanseri (HeLa), kemik kanseri (MG63) ve kan kanseri (K562) üzerindeki çoğalma, ölüm ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda büyüme inhibisyonun en fazla olduğu HeLa hücrelerinde %92 bunu takiben K562 hücrelerinde %84 ve MG63 hücrelerinde %48 oranında olduğu tespit edilmiştir (Yan vd., 2009).

Yapılan araştırmalar sonucunda yardımcı tedaviler kullanıldığında *Astragalus*'un Tip 2 diyabetli hastaların tedavisinde antidiyabetik semptomlarını önleyici, insülin direncini, açlık şekerini (FGG) ve HbA1c'yi düşürücü belirgin antidiyabetik etkileri ortaya konulmuştur (Tian vd., 2016).

Astragalus, anti-inflamatuar etkisinin yanı sıra damar genişletici etkiye göstermektedir. Histamin inhibisyonu ile antiinflatuar etki göstermektedir (Yusufoğlu vd., 2014).

Geleneksel Çin tıbbında, bazı bitkiler antik çağlardan beri anti-aging olarak kullanılmıştır. *Astragalus*'dan izole edilen bir saponin türü olan astragalosides (AST) 'in fareler üzerinde yapılan çalışmaları sonucunda antioksidan ve immünomodülatör etkilerinden dolayı hidrokortizon ile uyarılan farelerde yaşlanmayı geciktirdiği bildirilmiştir (Li vd., 2007).

1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

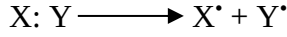
1.4.1. Serbest Radikaller

Atomik ya da moleküler orbitallerde bir veya daha fazla bağ yapmamış elektron veya atoma sahip moleküllere serbest radikaller denir (Jensen, 2003).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler.

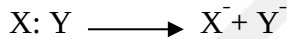
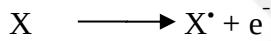
a. Kovalent bağın homolitik kırılması ile: Kimyasal bağların kırılmasına 500-600 °C deki yüksek sıcaklıklar ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar neden olur. Kırılma esnasında bağ yapısında bulunan iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalarak her iki atom

üzerinde paylaşılmamış elektron atomları bulunur. Kovalent bağlı bir molekülün her bir molekülünde paylaşılmamış elektron atomlarının kalması serbest radikal oluşmasına neden olur.



Reaksiyon 1: Kovalent bağın homolitik kırılması

b. Bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi: Molekülün heterolitik bölünmesinde kovalent bağı oluşturan her iki elektronun atomlardan birinde kalması sonucunda serbest radikaller oluşmayıp iyonlar meydana gelir. Radikal olmayan bir molekülün radikal forma dönüşümü, bu molekülün elektron kaybı sırasında dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalması sonucunda oluşur. Örneğin, askorbik asit (C vitamini), tokoferoller (E vitamini) ve glutatyon gibi hücrel antioksidanlar kendilerinin radikal formlarını oluştururken radikal türlerine tek elektron verip radikalleri indirgerler. Diğer bir örnek ise glutatyon (GSH) radikalleri indirgerken, kendisinin tiyol (RS⁻) radikali oluşur.



Reaksiyon 2: Bir bağın e^{-} kaybetmesi ya da heterolitik bölünmesi

c.Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Radikal özellik taşımayan moleküle tek bir elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturularak indirgenme radikal özellik kazandırabilir. Örneğin radikal formda olmayan moleküler oksijen tek bir elektron indirgenmesi ile radikal formu olan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) dönüşebilir. Radikal yapımı bu mekanizma ile biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleşir. Bu durum canlılar için önemli olup, canlılarda çok sayıda enzimatik ve nonenzimatik tepkimelerle süperoksit üretilirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin en fazla olduğu durum elektron transferidir. Serbest radikaller organik veya inorganik moleküler şeklinde ya da negatif yüklü, pozitif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (Halliwell vd., 1992).

Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektrona sahip oldukları halde serbest radikal değildirler. Bu iyonlar serbest radikal oluşumunda önemli bir role sahip olup serbest radikallerin oluşumunu sağlayan reaksiyonları katalizleyebilmektedirler (Doğmuş ve Durucasu, 2013). Oksijen biyolojik sistemlerdeki en yaygın olan serbest radikaldır (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Hücrel metabolizma ve enerji üretimi için moleküler oksijen (O_2), önemlidir. Ancak bu oksijen molekülünün parçalanması durumunda

bu molekül biyolojik dokulara önemli derecede zarar verebilecek potansiyele sahip yüksek oranda reaktif maddeler üretir (Wickens, 2001).

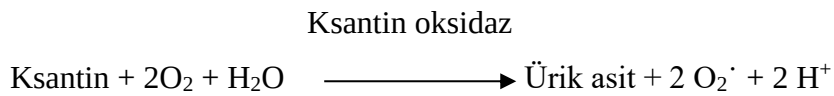
Serbest radikal reaksiyonları nötrofil ve makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin savunması için gereklidir. Fakat serbest radikallerin fazla üretilmesi sonucunda doku hasarı ve hücre ölümü meydana gelmektedir. Serbest radikaller hücrelerde bulunan lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklere etki ederek, bu bileşiklerin yapılarının bozulmalarına sebep olurlar (Babior, 2000).

1.4.2. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

- Alkol,
- Uyuşturucu,
- İskemi,
- Travma
- Aktive olmuş fagositler (respiratory burst),
- Cerrahi stres,
- Çevresel faktörler (sigara dumanı, aromatik hidrokarbonlar),
- Mitokondriyal elektron (e-) transportu: Hücrelerde en büyük serbest radikal

kaynağıdır. Elektron transportu sırasında, elektron sızması olur. Sızan e⁻ ların O₂' i indirgemesi ile ROS meydana gelir.

- Ksantin oksidaz: Enerji azlığı ve artmış intraselüler kalsiyum varlığında kalsiyuma bağımlı proteaz aktive olarak, ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz, ksantinün ürik aside dönüşümü sırasında O₂' oluşumuna neden olur.



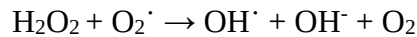
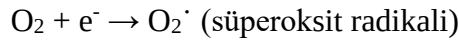
- Hemoglobin yıkımı: Hem yıkımında görevli bir enzim olan, hem oksijenaz enzimi ROS oluşumuna neden olur.
- Endoplazmik retikulum e-transport sistemleri,
- Peroksizomlarda bulunan oksidazlar: Bol miktarda hidrojen peroksit üretirler.

- Araşidonik asit metabolizması: Lipooksijenaz ve siklooksijenaz, reaksiyonun kataliz sırasında ROS oluştururlar (Demir, 2010).

1.4.3. Serbest Radikal Türleri

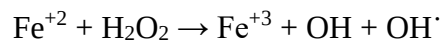
1.4.3.1. Süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda oluşan bir ajandır. Oksijen radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcıların otooksidasyonu ile üretilmektedir. $O_2^{\cdot-}$ oluşumu ortamdaki oksijenin derişimine ve elektron taşıyıcısının redoks durumuna bağlıdır. Uzun bir yarı ömre sahip olup, lipofilik özelliğindedir. Lipofilik özelliği sayesinde oluştuğu yerden difüzyonla uzak yerlere dağılabilmeyi sağlamaktadır. Bu zayıf $O_2^{\cdot-}$ radikalın tek başına hücrelerde önemli bir hasara yol açabilmesi mümkün görülmemektedir. Ancak $O_2^{\cdot-}$ radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Bu reaksiyonlardan en önemlilerinden biri Haber Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 , Fe^{+2} varlığında etkileşim göstererek oldukça reaktif olan hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikallerini oluşturmaktadır. Üretilen bu $OH^{\cdot}$ radikalleri DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (Akyol, 2007; Tokaç, 2007).



1.4.3.2. Hidroksil Radikalleri ($OH^{\cdot}$)

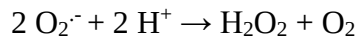
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ‘‘Haber Weiss’’ ve ‘‘Fenton reaksiyonu’’ sonucu hidrojen peroksitten oluşan bir radikaldir. H_2O_2 ’nin Fe^{2+} veya Cu^{2+} ile reaksiyona girmesi sonucunda $OH^{\cdot}$ radikali oluşmaktadır. Bunun yanı sıra suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşur (Emecen, 2009).



Bu reaksiyon 1984 yılında ilk defa Fenton tarafından gözlenmiştir ve Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir (Turan, 2011). Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitlerinden bir proton kopartarak karbon merkezli organik radikaller ($R^{\bullet}$), tiyol radikalleri ($RS^{\bullet}$), organik peroksitler ($RCOO^{\bullet}$) gibi yeni radikal moleküllerinin oluşmasına ve bunun sonucunda büyük hasara neden olurlar (Halliwell, 1994; Akyol, 2007). Hidroksil radikalleri hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girmektedir. Lipid, protein ve nükleik asitler radikal tepkimelerinde binlerce ara ürün oluşturabilirler. DNA ile tepkimesi sonucu, baz delesyonları, baz modifikasyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileriki safhada DNA molekülünde meydana gelen hasarlar tamir edilemeyip hücre ölümüne neden olurlar. Proteinler üzerinde oluşan oksidanlar yapı değişimine neden olur ve bu da proteinleri proteolitik yıkıma götürür. Hücre zarının su içermemesi hidroksil radikalının başlıca hedefinin yağ asitleri olmasına sebep olmuştur. Zar lipidlerinin peroksidasyonu hücre zarının yapısını bozar ve zar geçirgenliğini artırıp hücrenin ölümüne neden olabilir (Emecen, 2009).

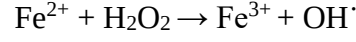
1.4.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Peroksit molekülü moleküler oksijenin çevresinde bulunan moleküllerden iki elektron alarak ya da süperoksit molekülünün bir elektron alması sonucunda meydana gelir. Hidrojen peroksit molekülü peroksit molekülünün iki hidrojen atomu ile birleşerek oluşturulur (Mısıır, 2013). H_2O_2 , süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu meydana gelir. H_2O_2 ve moleküler oksijen iki süperoksit molekülünün iki proton alması sonucunda oluştururlar. Reaksiyon sonucunda radikal olmayan ürünler meydana gelir ve bu durum, reaksiyonun bir dismütasyon reaksiyonu olduğunu göstermektedir. Reaksiyon aşağıda verilmiştir (Gutteridge, 1995; Tekkeş, 1995).

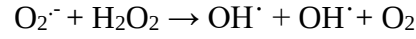


H_2O_2 eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından serbest radikal değildir fakat ROS kapsamına girererek serbest radikal oluşumda önemli rol oynar. H_2O_2 molekülü Fe^{2+} veya diğer geçiş metalleri ile reaksiyona girer ve Fenton reaksiyonu, süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) ile tepkimeye girmesi sonucunda da Haber-Weiss reaksiyonu oluşur. Her iki reaksiyonda

aşağıda verilen tepkimelerde gösterildiği gibi hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturur Hidroksil radikali zarar verici bir molekül olup en reaktif oksijen radikalidir (Jomova ve Valko, 2011).



Fenton Reaksiyonu

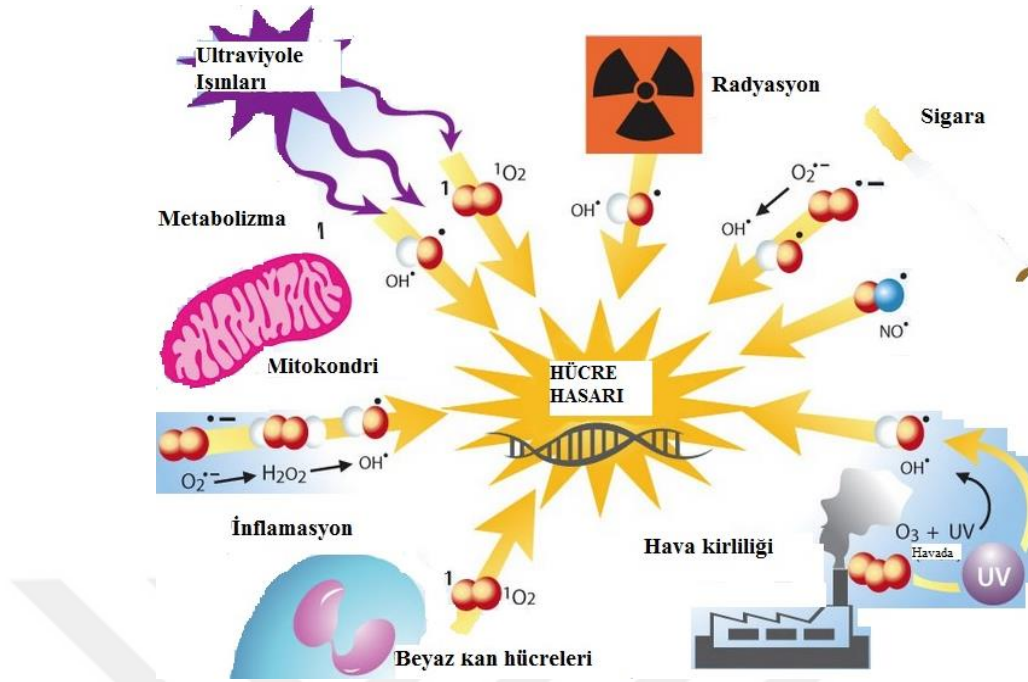


Haber – Weiss Reaksiyonu

H₂O₂ oksitleyici ve indirgeyici özelliğinin zayıf olması ve reaktif olmamasına karşılık yağda çözünebilir olmasından dolayı biyolojik membranları kolaylıkla geçebilir. O₂^{•-} radikalinde ise bu özellik yoktur. H₂O₂ bu özelliği sayesinde olduğu yerlerden çok uzaklara gidip hücre kompartmanları boyunca hücreler arasında serbest radikal indüklü hasarı iletmektedir. H₂O₂ Fenton reaksiyonu boyunca proteinlerin tiyol grubundaki enzimlerini, hücre zarındaki fosfolipid moleküllerini, karbohidrat ve DNA moleküllerini hedef alarak hasara yol açabilir (Halliwell vd., 2000).

1.4.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

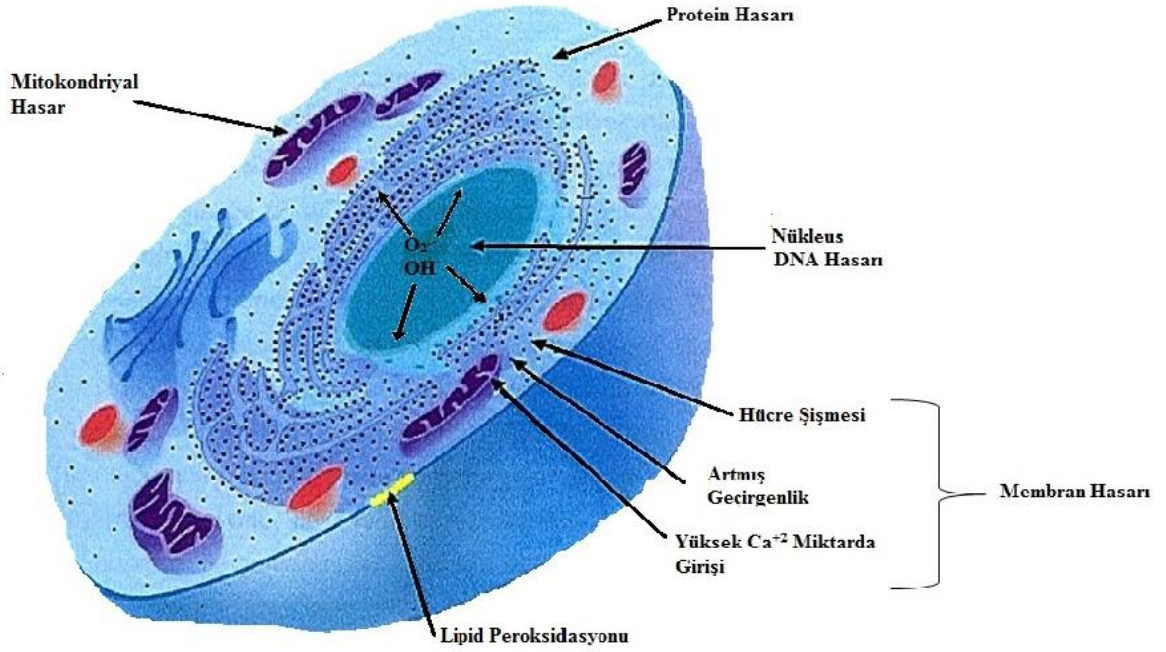
Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu enflamasyon, yaşlanma, radyasyon, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO₂), ozon, azot dioksit (NO₂), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar (Dinçer ve Akçay, 2000). Reaktif oksijen türlerini oluşturan durumlar Şekil 1.2’de özetlenmiştir.



Şekil 1.2. Reaktif oksijen türlerini oluşturan bazı durumlar

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, enzim ve karbohidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Turan, 2011). Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Hücre ve dokularda ROS'un etkisi Şekil 1.3'de gösterilmiştir. Serbest radikallerin zararları;

1. Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı,
2. DNA'nın tahrip olması
3. Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
4. Membran proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
5. Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
6. Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonun değişmesi
7. Proteinlerin hasar görmesi ve protein "turnover"nin artması şeklinde özetlenebilir (Sarı, 2008).



Şekil 1.3. Hücre ve dokularda ROS etkisi

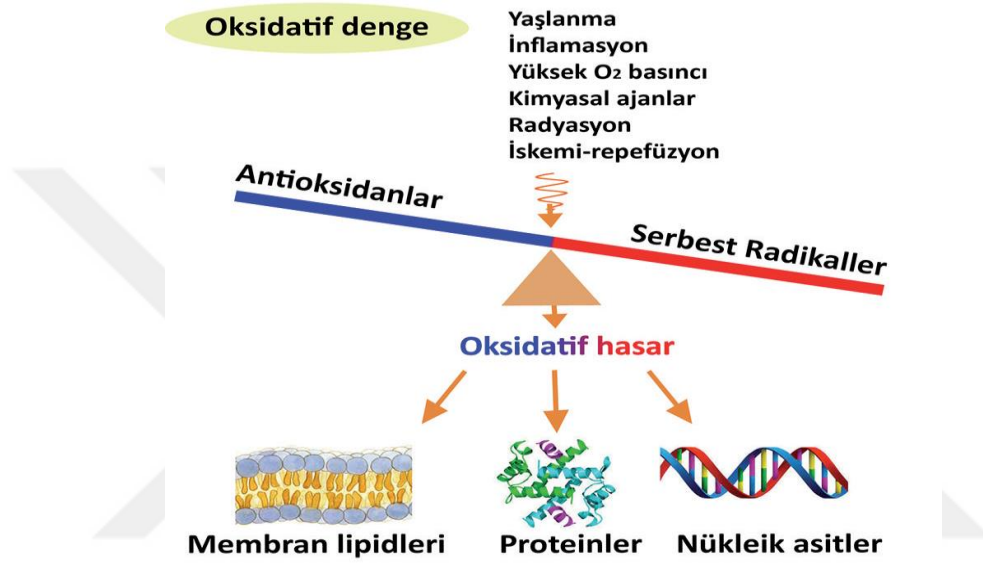
Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarına neden olduğu ve bu radikallerin birçok patolojik olayda ve hastalıkta rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlar;

- İskemi reperfüzyon hasarı,
- Parkinson hastalığı,
- Alzheimer hastalığı,
- Akut renal yetmezlik,
- Diyabet,
- Böbrek yetmezliği,
- Anfizem/bronşit,
- Kanser,
- Yaşlanma.

Serabrovasküler bozukluklar gibi durumlarda da ROS aracılıklı hücre hasarı söz konusudur (Halliwell 1987; Freeman ve Crapo, 1982).

1.4.5. Oksidatif Stres

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller ve bu serbest radikallere karşı oluşturulan süpürücü etkiye sahip antioksidanlar arasında bir denge vardır. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin bozulmasına oksidatif stres denir (Özen vd., 2015). Oksidatif dengenin sağlanması durumunda organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir.



Şekil 1.4. Oksidatif Stres (Özen vd., 2015).

Oksidatif stresin bulguları;

- Serbest tiyol oksidasyonu ve protein disülfidlerinin ortaya çıkması,
- ATP havuzundaki azalma,
- Serbest sitozolik kalsiyumun yükselmesi,
- Sitoiskelet elemanlarının bütünlüğünün kaybolması,
- Plazma membranının geçirgenliğinin artması,
- Plazma membranında artmış peroksidasyon,
- Sitozolik bileşenlerin hücre dışına çıkması,
- Artmış DNA hasarı (Lima vd., 2006).

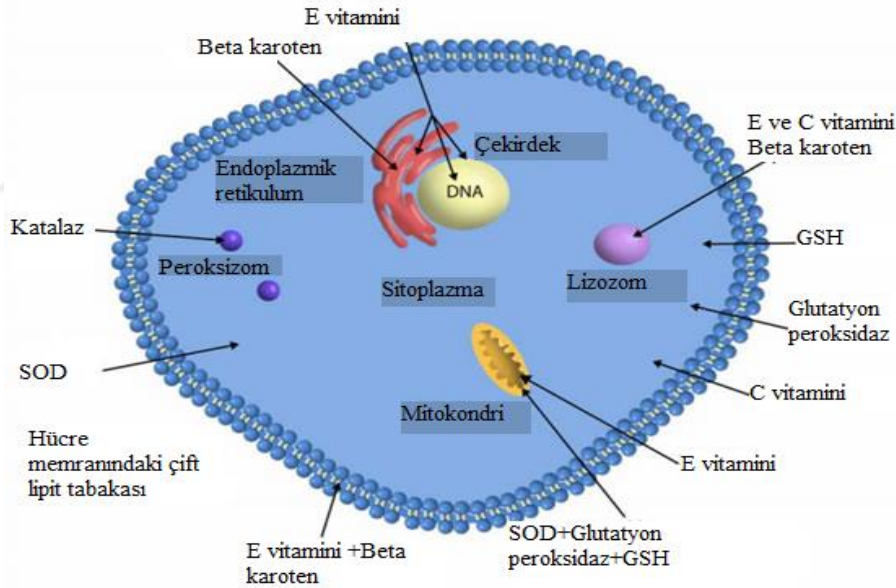
Oksidatif stres ve etkileri Şekil 1.4’de özetlenmiştir.

Mitokondrilerdeki oksidatif metabolizmanın ürünleri endojen ROS’ların esas kaynağıdır. ROS’lar her zaman hücrel metabolizmanın bir ürünü olmayabilir; sitokinlere,

büyüme faktörlerine ve spesifik sinyal yollarındaki ikincil habercilere cevap olarak özel plazma membran oksidazları tarafından da üretilir (Abraham, 2001). Oksidatif dengenin bozulması vücutta geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir. Oksidatif stresin neden olduğu hastalıklar; başta kanser olmak üzere, diyabet, nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler bozukluklar, amiloidoz, yaşa bağlı olarak gerçekleşen bağışıklık yetersizliği, yaşlılarda bunama (senil demans) ve hipertansiyon gibi hastalıklar ile ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinin sorumludur (Çakatay ve Kayalı, 2006).

1.4.6. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar radikal oluşumunu sınırlandırır, oluşan radikal reaksiyonlarını sonlandırır ve oluşan radikal moleküllerini etkisiz hale getirerek hasarlı molekülleri ortadan kaldırır.



Şekil 1 5. Antioksidan savunma sistemi

Vücutta veya yiyeceklerde düşük miktarda bulunan antioksidanlar, oksidasyonu önemli derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir (Halliwell, 1995). Hücreye zarar veren prooksidanları yani reaktif oksijen ve azot türleri ile serbest radikalleri, antioksidanlar aktif bir şekilde bu molekülleri indirgeyerek daha az zararlı veya zararsız ürünlere dönüştürürler. Prooksidanlar reaktif türler için kullanılan terimler olup, nükleik asitler,

proteinler ve lipitlerde oksidatif hasara neden olmaktadır. Bunun sonucunda proksidanlar çeşitli patolojik olaylara ve hastalıklara neden olan zararlı maddelerdir (Cao ve Prior, 1999). Antioksidanlar oksidanları dört yolla etkisiz hale getirirler:

a. Süpürme (Scavenging) etkisi: Radikal oluşumunu engelleyip, oluşan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Süpürme etkisi gösteren bileşiklere örnek olarak, metal bağlayıcı bazı proteinler ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimleri verilebilir.

b. Söndürme (Queching) etkisi: Oksidan molekülleri ile birleşerek onlara bir hidrojen aktararak oksidan aktivitelerini söndürüp inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örneğin; A, C ve E vitaminleri, flavanoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.

c. Zincir kırma (Chain Breaking) etkisi: Zincirleme olarak devam eden tepkimelerin belirli yerlerinden kırılmasını sağlayarak, oluşan oksidan molekülleri kendilerine bağlayarak etkisiz hale getirirler. Örneğin; hemoglobin, ürik asit, seruloplazmin, bilirubin, albümin, ağır mineraller ve oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive ederler.

d. Onarma (Repair) etkisi: Hasara uğramış olan biyomolekülü onarıp oksidan moleküllerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Örneğin; DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz (Gökpınar vd., 2006; Arkan, 2011).

1.5. Antioksidanlar

1.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana grupta toplanırlar (Emecen, 2009). Antioksidan savunma sistemi Şekil 1.5’de özetlenmiştir.

1.5.1.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar (Öztürk vd., 2009).

Enzimatik antioksidanlar; redoks döngüsünde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz (CAT) gibi enzimler, enzimatik antioksidanları oluştururlar. Bunların yanı sıra glutatyon S transferazlar, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidaz enzimleri de enzimatik antioksidanlardandır.

Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit radikallerine karşı temel savunmadır ve oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bu enzim süperoksit molekülünün hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.

Katalaz (CAT)

Hücre dışında bulunmaz peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Kemik iliği, kan, böbrek ve karaciğer hücrelerinde bulunur. Hidrojen peroksit ve metil hidroksiperoksit gibi küçük moleküllere etki ederek oksidazların etkisi ile oluşan toksik H_2O_2 'nin suya ve oksijene kadar parçalanmasını sağlar (Giles ve Jacob, 2002).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Sitozol ve mitokondri içerisinde bulunur. H_2O_2 'yi parçalayarak zararsız olan suya dönüştürür. Bu reaksiyonda GSH kullanılır ve yükseltgenerek okside glutatyona (GSSG) dönüştürülür (Clarkson, 1995).

Sitokrom Oksidaz

Oksijenin suya indirgenmesi esnasında oluşan aktif oksijenin ortama salınımını durdurarak, ROS oluşumunu engeller (Özcan vd., 2015).

Enzimatik olmayan antioksidanlar

Transferrin: Ferrik halde bulunan demir iyonlarını (Fe^{3+}) bağlar.

Laktoferrin: Ferrik halde bulunan demir iyonlarını (Fe^{3+}) düşük pH değerlerinde bağlar.

Ürat: Metalleri bağlar ve radikalleri temizler.

Albümin: $HClO$ 'u ortamdan temizler. Bakır ve hem grubunu bağlar (Özen vd., 2015).

Haptogloblin: Hemoglobini bağlar.

Ferritin: Dokularda bulunan demiri bağlar.

Bilirubin: Süperoksit ve hidroksil radikallerini toplar.

Metiyonin: Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona giren bu molekül hücreleri oksidatif hasara karşı korur.

Sistein: Süperoksit ve hidroksil radikallerini toplar (Emecen, 2009).

Glukoz: Hidroksil radikalini giderir.

Glutasyon: Hücre içerisinde indirgen formda (GSH) bulunup, endojen peroksitlere karşı okside olarak bu peroksitleri indirger.

Melatonin: Hidroksil radikalini temizler. Hücre çekirdeğine giren ve DNA'yı oksidatif hasara karşı koruyan çok güçlü bir antioksidandır (Boğa, 2013).

Seruloplazmin: Bakır iyonlarını bağlar, hidrojen peroksidi kullanarak bakırın reoksidasyonunu sağlar. Ferro demirini (Fe^{2+}) ferrik demirine (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve hidroksil radikal oluşumu engeller (Özen vd., 2015; Emecen, 2009).

1.5.1.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vitaminler, gıda ve ilaç antioksidanları olarak sınıflandırılabilirler.

Vitaminler; C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α - tokoferol), folik asit (folat), β -Karoten ve A vitamini.

İlaçlar; endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar, barbitüratlar, rekombinant süperoksit dismutaz ve ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri, troloks-C, nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar, nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler, demir şelatörleri.

Gıdalar; flavonoidler, propilgalat, bütillenmiş hidroksianosol (BHA), sodyum benzoat, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), etoksikuin, Fe-süperoksit dismutaz şeklindedir (Akyurt, 2014).

C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini, hücre sitoplazmasında ve hücre dışı sıvıda bulunan suda çözünen bir vitamindir. Özellikle meyveler ve sebzeler başta olmak üzere çok çeşitli gıdalarda bulunur. C vitamini, oksijen türlerini, reaktif azot ve reaktif klor türlerini kolayca süpürür ve böylelikle diğer substratları oksidatif hasara karşı korur (Palmer vd., 2003; Güçlü vd., 2005; Keskin ve Erkmen, 1987).

E vitamini (Tokoferol)

E vitamini yağda çözünebilen bir vitamin olup başlıca bitkisel ürünlerde mevcut olan bir vitamindir. Hücre ve mitokondriyal membranlarda bulunup ROS'lar üzerine direk etkisinden dolayı en güçlü zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir (Evans, 2000). E vitamini hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır (Yoshihara vd., 2010).

β -Karoten ve A vitamini

A vitamini lipid özellikli birçok maddede bulunan ve yağda çözünebilen bir vitamindir. Yapısal olarak karotenlerle ilişkilidir. β -Karoten hücre membranında bulunur ve karaciğerde A vitaminine dönüştürülür. β -Karotenin ROS'ları inaktive ettiği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür. β -Karoten ve A vitaminin reaktif oksijen türlerine karşı etkinliği E ve C vitaminine kıyasla daha azdır (Ozhogina ve Kasaikina, 1995; Palace vd.,1998).

1.6. Diyabet

Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu tanıma göre diyabet, birçok sebebe bağlı olarak ortaya çıkabilen insülin salınımı ya da insülin aktivitesinde meydana gelen bozukluğa bağlı olarak oluşan, yüksek kan şekeri yani hiperglisemi ile karakterize edilebilen karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki düzensizlik ile süregelen metabolik bir hastalıktır (World Health Organization, 1999).

α -glukozidaz enzimleri ince bağırsağın mikrovillus denilen fırçasımsı yüzeyinde bulunurlar. Bu enzimler polisakkaritlerin parçalanmasından sorumlu olup oligo ve disakkaridleri monosakkaridlere kadar yıkarak, monosakkaridlerin bağırsak duvarından kolayca emilip kana geçmesini sağlarlar (Mai vd., 2007). Vücuttaki kan glukoz seviyesinin düzenlenmesi pek çok sayıda kimyasal madde ve hormonun kompleks bir şekilde etkileşimi ile gerçekleşmektedir. Bu düzenlemede insülin hormonu görevlidir. İnsülin hormonu pankreasın Langerhans adacıklarının beta hücrelerinden sentezlenmektedir. Pankreastan yeterli insülin salgılanamaması, insülinin yeterli cevap oluşturamaması veya insülin hormonundaki yapısal bozukluklar sonucu diyabet meydana gelmektedir (Sharma vd., 2010). Diyabet Tip 1 ve Tip 2 şeklinde ikiye ayrılmaktadır (Inzucchi, 2003).

Tip 1 Diyabet

İnsüline bağımlı diyabet (IDDM) de denilmektedir. Pankreasta beta hücrelerinin harabiyeti sonucunda gelişen total ya da kısmi insülin yetmezliği ile karakterize edilen otoimmün bir hastalıktır (Karaman ve Elgin, 2016). Tip 1 diyabet bağışıklık sistemine bağlı olabilir ya da koksaki gibi bir virüs veya kabakulak gibi bir hastalık sonucu ortaya çıkabilir (Akyurt, 2014). Çocukluk döneminde başladığından bu diyabet türü için "juvenil diyabet"

terimi de kullanılır. Hastalık genellikle çocukluk ve ergenlik döneminde 30 yaşın altında başlayabildiği gibi her yaş döneminde de görülebilir. Genellikle ani olarak başlar ve progresif şekilde devam eder (Karaman ve Elgin, 2016). Belirtileri kilo kaybı, poliüri, polifaji, polidipsi, ketoasidöz, susuzluk ve ağız kuruluğudur. Uzun süre hiperglisemiye maruz kalınması sonucunda retinopati, nöropati ve nefropati gibi semptomlar oluşmaktadır. Diyabet vakalarının %10-%15'ini kapsar (Karaman ve Elgin, 2016; Daneman, 2006). Tip 1 diyabetin tedavisi insülin ve diyetdir. Oral antidiyabetikler bu hastalığın tedavisinde etkili değildirler (Akyurt, 2014).

Tip 2 Diyabet

İnsüline bağımlı olmayan tip (NIDDM) denir. Dünyada en sık görülen endokrin hastalıklarındandır. Bütün DM'lerin %90-95'ini oluşturmaktadır. Obezite ve hareketsiz yaşamla güçlü şekilde ilişkili olan insülin direnci ve beta hücrelerinin işlevsel bozukluğuyla aşamalı gelişen bir hastalıktır (Zimmet vd., 2001). Ailede çoğunlukla diyabet öyküsü vardır. Genellikle 35-40 yaş sonrasında görülmektedir. Fakat bu hastalık son yıllarda 18-24 yaş grubundaki genç erişkin bireylerde ve 11-13 yaş grubundaki ergen bireylerde de sıklıkla görülmeye başlamıştır. Tip 2 diyabette insülin normal olarak salgılanır fakat hormonların hücrel reseptörlerinden yararlanılmamaktadır ve bunun sonucunda insüline karşı direnç oluşmaktadır (Büyüköztürk, 1992). Bu hastalıkta az miktarda endojen insülin salgılabildiği için insülin tedavisi altında iken insülin almayı unuttuklarında diyabetik ketoasidoz gelişmez. Hastalar kilo verdiklerinde veya yemedikleri zaman oral antidiyabetik ilaçlar veya insülin ile tedaviye ihtiyaç duymazlar. Tip 2 diyabetin tedavisi; hipoglisemikler, alfa-glukozidaz inhibitörleri, şeker sınırlandırıcı diyet ve bağırsaklardan glukoz emilimini geciktiren kompleks karbohidrat preparatları ile yapılmaktadır (Akyurt, 2014). Tip 1 ve Tip 2 diyabetin karşılaştırılması Tablo 1.1' de verilmiştir.

Tablo 1.1. Tip 1 ve Tip 2 diyabetin karşılaştırılması

Tip 1 DİYABET	Tip 2 DİYABET
Genellikle 30 yaşın altında başlar	30 yaşın üstünde başlasa da bazen çocuklar da bile görülebilir.
Genetik eğilimi düşük	Genetik eğilimi yüksek
İnsüline bağımlı diabetes mellitus (IDDM)	İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM)
Fenotip zayıf	Fenotipi obez
Ketoasidoza yatkınlık var	Ketoasidoza yatkınlık yok
Endojen insülin çok az veya yok	Endojen insülin var
İnsülin direnci sadece kan glukoz düzeyi yükselince olur.	Hemen hemen her zaman insülin direnci vardır.
İdrarda şeker ve aseton vardır.	İdrarda şeker vardır.
Tek tedavi yöntemi insülinidir	Diyetle tedavi edilebilir.

1.6.1. Diyabet ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki oksidatif dengenin bozulmasıdır. Bu durum diyabetin kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır (Memişoğulları, 2005). Yapılan çalışmalar incelendiğinde diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabet hastalarında lipid peroksidasyonunu artıran serbest radikaller oksidatif stresin neden olduğu gösterilmiştir. Oluşan oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve diyabetin ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Pitkanen vd., 1992). Oksidatif stres belirteci olan lipid hidroksiperoksidler, konjuge dienler, tiyobarbitürük asit reaktif maddeler (TBARS) ve isoprostanların düzeylerinin diyabetli hastalarda arttığı ve bu hastalarda antioksidan parametreler olan E ve C vitaminlerinin ve glutatyon, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerinin miktarlarında azalma olduğu görülmüştür. Bu durumun oluşması diyabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesinde oksidatif stresin önemli rolü olabileceğini göstermektedir (Memişoğulları, 2005). Lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu indeksinin ölçülmesi sonucunda artan oksidatif stresin hem Tip 1 (IDDM) hem de Tip 2 (NIDDM) diyabette artmış olduğu tespit edilmiştir (Atalay ve

Laaksonen, 2002). 1980’li yıllardan beri reaktif oksijen türlerinin diyabet üzerindeki etkileri tartışılan bir konu olmuştur. Deneysel olarak diyabet oluşturan rat modellerinde 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) oksidatif stres belirteci olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak bu molekül seviyesinde artış olduğu gözlenmiş ve yapılan çalışmalar doğrultusunda serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonu içeren ortamda bekletilen endotel ve kas hücrelerinde serbest radikal oluşumu başladığı tespit edilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalar hipergliseminin oksidatif stresle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Deneysel hayvan çalışmalarında streptozotosin kullanılarak hayvanlarda insanlardakine benzer diyabet oluşturulmaktadır. Streptozotosin N-nityroso türevi olan D-glukozamin yapısında bulunmaktadır. Oksidan maddeler oluşturarak pankreasta bulunan Langerhans adacıklarını selektif olarak tahribata uğratmaktadır. Ayrıca streptozotosinin uygun olmayan NO cevapları oluşturarak diyabeti başlattığı düşünülmektedir (Akyurt, 2014). Beta hücreleri oksidatif strese oldukça duyarlı yapılardır ve hücrelerde oluşan hasarın hipergliseminin toksik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Robertson vd., 2004).

1.6.2. Tıbbi Bitkiler ve Diyabet

Şeker hastalığı, nefes darlığı ve sarılık gibi birçok hastalık insanlık tarihi boyunca bitkiler ile tedavi edilmeye çalışılmış ve çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO), bildirisine göre dünyada yaklaşık 4 milyar insanın (dünya nüfusunun %80’i) sağlık sorunlarını çözebilmek adına ilk etapta bitkisel ilaçlara başvurduğu ifade edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde reçeteli orak satılan ilaçlarda yaklaşık olarak %25 oranında bitkisel kökenli etken maddelere (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin) rastlanmıştır. Özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin 1990’lı yıllardan sonra yeni kullanım alanları bulunmuş ve doğal ürünlere olan talep artmıştır. Bu durumun gerçekleşmesi tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanını her geçen gün artırmasına sebep olmuştur. Bu bitkilerin günümüzde piyasasının 60 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Türkiye’de doğal olarak yetişen 11700 kadar taksonun yaklaşık üçte biri endemiktir. WHO raporuna göre dünya üzerinde tıbbi amaçlı olarak kullanılan yaklaşık 70000 kadar bitki vardır. Bu bitkilerin 21000 kadarı ilaç sanayinde kullanılmakta olup 110 ülke arasından Türkiye tıbbi bitki ihracatı yapan ülkeler arasında 18.sırada yer almaktadır (Karaman ve

Cebe, 2016). Ebers papirüslerinden edinilen bilgilere göre diyabet tedavisi amacıyla tıbbi bitkilerin kullanımı M.Ö 1550 yıllarına kadar gitmektedir (Pushparaj vd., 2000).

Diyabet tedavisinde doğal kaynaklı ilaçların kullanılması ve doğal kaynaklı yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi 20.yüzyılın ilk çeyreğinde başlamıştır. *Galega officinalis* bitkisi üzerinde ilk çalışmalar yapılmış ve bitkinin hipoglisemik etkili guanidin türevi bileşiklerince zengin olduğu tespit edilmiştir (Karaman ve Cebe, 2016).

Dünyanın pek çok yerinde geleneksel yöntemlerle çeşitli bitkiler kullanılarak diyabetin tedavisi yapılmaktadır. Kullanılan bu geleneksel yöntemler ile gerçekleştirilen bitki tedavilerinin bir kısmı bilimsel çevreler tarafından dikkate alınmakta ve bu alandaki çalışmaları WHO desteklemektedir (WHO, 1980). Modern tıpta diyabet tedavisinde insülin ve oral antidiyabetikler kullanılmaktadır. Fakat bu antidiyabetik ilaçların sağlanması, saklanması, uygulanması ve bunların yanı sıra ilaçların yan etkileri gibi nedenlerinden dolayı alternatif olarak yeni, doğal ya da sentetik antidiyabetik ilaç arayışlarına yönelimi başlatmıştır (Marles ve Farnsworth, 1995).

Diyabet tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçlar geliştirmek için yararlı kaynaklar sağlayabilecek birçok antidiyabetik bitki vardır. Etnobotanik bilgiye göre diyabet tedavisinde 800'den fazla bitkinin geleneksel ilaç olarak kullanıldığı ancak bu bitkilerin birçoğunun bilimsel incelemeye tabi tutulmadığı belirtilmiştir (Moezi vd., 2018).

Günümüze dek bilimsel çalışmalara konu olmuş 1050'den fazla antidiyabetik etki gösteren bitki bulunmaktadır. Bu bitkilerin 300'ünden aktif antidiyabetik bileşikler izole edilmiştir. Bu çalışmalarda bileşiklerin tümü tanımlanmamıştır. Bitkilerde bulunan tanımlanmış olan fitokimyasal gruplar, polifenoller, terpenoidler, steroidler ve saponinler, alkaloidler ve nişasta olmayan polisakkaritlerdir. Birçok antioksidan polifenol grupları; flavonoidler, antosiyaninler, ksantonlar, stilbenler, kininler, tanenler vb. yapılar lipid peroksidasyonunu, proteinlerin glikozilasyonunu ve oksidatif stresi azaltırlar.

Dünyada kan şekerini etkileyen bitkilerin sayısı 375 'den fazladır. Ülkemizde bulunan antidiyabetik bitkilerin 69 çeşidi farklı bölgelere yayılmıştır (Hazer ve Hamamcıoğlu, 2017). Bu bitkilerden birkaçı aşağıda Tablo 1.2'de belirtilmiştir.

Tablo 1.2. Kan şekerini etkileyen bitkiler ve fitokimyasal etkileri

Bitki Kaynağı	Fitokimyasallar	Türkiye’de yayılışı
<i>Daucus carota</i> L. (Apiaceae)	Falcarinol (poliasetilen)	Anadolu (Bhattacharya, vd., 2014)
<i>Chelidonium majus</i> L. (Papaveraceae)	Berberin, alkaloid	Kuzey Anadolu (Xia, vd.,2011)
<i>Lathyrussativus</i> L. (Fabaceae)	Inositol fosfoglikan	Anadolu (Kuzeydoğu Hariç) (Paneda, vd., 2001)
<i>Robiniapseudoacacia</i> var. <i>Umbraculifer</i> DC. (Fabaceae)	Amorfastilbol	Kuzey Anadolu (Wang, vd., 2014)
<i>Trifolium pratense</i> L. (Fabaceae)	Genistein, Biokanin A, 6- hidroksidaidzein izoflavon,3’hidroksigenistein	Trakya Anadolu (Wang, vd., 2014)
<i>Sambucus nigra</i> L. (Adoxaceae)	α -Linolenik asit, linoleik asit ve naringenin	Trakya, Kuzey, Batı ve Doğu Anadolu (Wang, vd., 2014)

1.7. Hemoliz

Kırmızı kan hücrelerinin temel fonksiyonu, hem demir (Fe^{++}) iyonlarını oksijenleyerek akciğerlerden oksijeni, dokulara iletmektir. Oksijenin %98’i eritrositlerde %2’si ise plazmada taşınır (Bain, 2017). Hemoliz, eritrosit zarının yıkıma uğraması sonucu hemoglobin ve diğer hücre içi bileşenlerin kan plazmasına karışmasına neden olan patolojik bir işlemdir (Li-Mancilla vd., 2015; Lippi, 2011).

Hemoliz görsel olarak tanımlanırsa 0.3 g/L’nin (18.8 mmol/L) üzerindeki serbest hemoglobin konsantrasyonu serum veya plazma kırmızı veya pembe renk verir, azalan kırmızı kan hücresi yoğunluğundan dolayı kan örneği berraklaşmaya başlar (Lippi vd., 2008). Hemoliz tıp biliminde *in vivo* ve *in vitro* hemoliz olmak üzere temel olarak iki farklı şekilde meydana gelen önemli bir olgudur. *In vivo* hemoliz, kemik iliği aktivitesinin eritrosit yıkım miktarını telafi edilemediğinde hemolitik anemiye yol açabilecek dolaşımdaki eritrositlerin erken yıkımı olarak tanımlanır. Eğer kemik iliği parçalanmış kırmızı kan hücrelerinin miktarını karşılayamazsa hemolitik anemi meydana gelir (Lippi vd., 2011).

In vivo hemolize yol açan nedenler arasında antikorlar, tıbbi tedavilerin biyokimyasal etkileri, toksik maddeler, kalıtsal faktörler (örn., hemoglobinopatiler), enzim eksiklikleri (akolürik sarılık) veya enfeksiyonlar (örn., sıtma) yer alır (Coşkun vd., 2005). *In vitro* hemoliz, kan örneğinin çeşitli nedenlerle dış ortamda parçalanmasıdır (Lippi vd., 2011). *In*

vitro hemolize neden olan olaylar; uygunsuz örnek toplama, örnek işleme ya da santrifüj nedeniyle olabilir. Kan alımı ve sonrasında *in vitro* hemoliz gerçekleşir (Coşkun vd., 2005).

Kan alımı sırasında;

- Özellikle yüzeysel venlerden kan alımı sırasında kuvvetli aspirasyon meydana gelmesi (ince uçlu iğne kullanılması, kalın uçlu iğneye oranla düşük akım hızı ve türbülans oluşturarak daha az hemolize neden olur.)
- Numunenin enjektör ile alınmasında iğne ucu çıkartılmadan kanın tüplere tazyikle boşaltılması
- Alkol gibi dezentekfanların kan alımı öncesinde tam olarak buharlaşmasının sağlanmamış olması
- Kullanılan tüpün kurumamış ya da kimyasal kirli olması
- Venöz ya da arteriyer kateterde kısmi tıkanıklık oluşması sonucu enjektör ile kan alımı sırasında daha kuvvetli aspirasyon gerekmesi.

Kan alımı sonrasında;

- Tüp içerisinde negatif ya da pozitif basınç bulunması
- Hipotonik solüsyonla kan örneğinin dilüsyonu
- Tam kan örneğinin dondurulup çözülmesi
- Kan örneğinin gün içerisinde farklı sıcaklıklarda saklanması ve taşınması
- Tüplerin taşınması sırasında oluşan mekanik etki
- Antikoagülanlı tüpün şiddetli bir şekilde çalkalanmış olması
- Koagülasyon tamamlanmadan önce kan örneklerinin santrifüjlenmesi veya hatalı santrifüj ile fazla sarsılması

In vivo hemolizin tüm hemolizler içinde görülme sıklığı %3,2 oranındadır (Carraro vd., 2000). *In vitro* hemoliz daha sık görülen bir olaydır (Koseoglu vd., 2011).

1.7.1. Eritrositler (Alyuvarlar)

Kan örneği incelendiğinde insanda en fazla bulunan kırmızı kan hücreleri eritrositlerdir.

Disk şeklinde olup orta bölümü kenarlara göre daha incedir. Bu disk oksijen değişimi için geniş bir yüzey sağlar. Olgun eritrositler diğer hücrelere göre farklılık gösterirler. Bu farklılığın sebebi bulundurdıkları nükleusu kemik iliğinde üretip dolaşıma geçtiklerinde kaybetmeleridir. Mitokondri, golgi aygıtı, ribozomları ve endoplazmik retikulum gibi

organalleri de kaybetmiştir. Eritrositlerin yapısında kana kırmızı rengini veren hemoglobin adında kompleks bir protein bulunur (Bain, 2017).

1.7.1.1. Eritrositler ve Oksidatif Stres

Eritrositler reaktif oksijen (ROS)'dan ilk etkilenen hücrelerdir. Bu nedenle eritrositler oksidatif stres çalışmalarında geniş çapta kullanılan kırmızı kan hücreleridir (Carl vd., 2016). Eritrositlerin içerisindeki hemoglobinin yapısında oksidasyonu katalizleyen ferro demiri (Fe^{3+}) ve membranlarında oldukça yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bulunmaktadır. Bu yapılar eritrositlerin ROS saldırısına karşı hassas olmalarına neden olur. Oksidanlar eritrositlerin hücre zarlarında önemli değişikliklere yol açarak eritrosit şekillerinde bozulmalara neden olur. Bunun sonucunda yüksek molekül ağırlığına sahip proteinler üretilir ve iskelet protein içeriği azaltılır. Tüm bu etkiler eritrosit membranında lipid peroksidasyonu (LPO) meydana getirmektedir (Khalili vd., 2014).

1.7.1.2. Eritrositlerde Oksidatif Stresin Oluşması

Hiperglisemi

Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresle ilgili çalışmaların pek çoğunda eritrositlere *in vitro* olarak ya glukoz ya da streptozotosin (STZ) uygulanmıştır (Balkan, 2017). Bunun sonucunda hiperglisemi antioksidan savunma sisteminin kapasitesini azaltarak reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olduğu bulunmuştur (Demir ve Yılmaz, 2014).

Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) eritrosit membranlarından kolayca geçen, hızlı bir şekilde hemoglobin ile reaksiyona giren ve hidroksil radikali gibi çok reaktif ROS'ları üretebilen bileşiktir (Van der Berg vd., 1992).

Eritrositlerin reaktif oksijen radikallerine maruz kalmasının sonucunda, hemoglobin spektrin çapraz bağlanmasına, proteinlerin glikozilasyonuna, enzimlerin etkisizleşmesine membrandaki çift lipit tabakanın bozunmasına ve hemolize neden olduğu gösterilmiştir. Tüm bu etkilerin sonucunda eritrositlerde meydana gelen deformabilite oksidatif hasarın belirteci olarak kabul edilmektedir (Srouf vd., 2000).

Ekzojen Kaynaklı Radikaller

Oksidatif stres oluşturmak amacıyla ekzojen kaynaklı radikaller kullanılır. Bu radikallerin hücrelerde proteinlerin -SH gruplarında ve lizin rezidülerinde, kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyona, potasyum sızıntılarına, membranlarda bozulmalara ve liziz gibi çeşitli yollarla oksidatif hasara yol açarlar (Suwalsky vd., 2007). 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorit (AAPH) eritrosit çalışmalarında kullanılan radikallerden olup, suda azo bileşiklerine kadar çözünür. Azo bileşikleri oksidasyon reaksiyonlarını başlatarak, eritrositlerde lipid peroksidasyon çalışmalarında ve antioksidan araştırmalarında sıklıkla kullanılır (He vd., 2013; Balkan, 2017).

Ekzojen kaynaklı diğer radikaller tert-butil hidroksiperoksit (t-BuOOH/t-BHP), difenil-2-pikrihidrazil hidrat (DPPH) ve hipokloröz asit (HClO) bileşikleri (Suwalsky vd., 2007; Arbos vd., 2008; Maurya ve Rizvi, 2009; Olchowik vd., 2012) olup bu radikaller ile ilgili yapılan çalışmalarda malondialdehit oksidatif hasar belirteci olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak MDA ve hemoliz değerlerinde bir artışın olduğu ve antioksidan savunma sistemi olan GSH değerlerinde ise azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda oksidatif stresin oluşmasında ekzojen kaynaklı radikallerin rol oynadığı söylenebilir (Balkan, 2017).

Pestisitler

Pestisitler fiziksel, kimyasal veya biyolojik sentetik ajanlar olup, istenmeyen hayvan, bitki ve mantarları öldürmektedir. Bu ajanlar biyolojik sistemler üzerinde ROS seviyesini artırabilir, hücre metabolizmasındaki GSH gibi indirgeyicilerin rezervlerini tüketebilir ve antioksidan potansiyelini azaltarak oksidatif stresin oluşumunu tetikleyebilirler (Kaymak vd., 2014)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Giriş

2.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzemeler

Tablo 2.1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	Marka/Model
Buzdolabı	Beko
Değirmen	IKA A10 Basic
Blender	Waring 8011 EB
Hassas Terazı	Shimadzu
Etüv	Memmert
Çalkalayıcı İnkübatör	Shel Lab
Vorteks	Heidolph
Santrifüj	Allegra X-30R
pH-metre	Hanna Instruments
Mikropleyt okuyucu	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı	IKA RH Basic 2
96 Kuyucuklu mikropleyt	Lp Italiana Spa
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Eppendorf tüpü	ISO Lab
15 mL ve 50 mL'lik steril falkon tüpleri	ISO Lab
Biyokimya tüpü	BD vacuteiner
Hemogram tüpü	BD vacuteiner
Pudrasız eldiven	Kimtech
Tüp sporu	Lp Italiana Spa
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje)	ISO Lab
Spektrofotometre küveti	Eppendorf

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

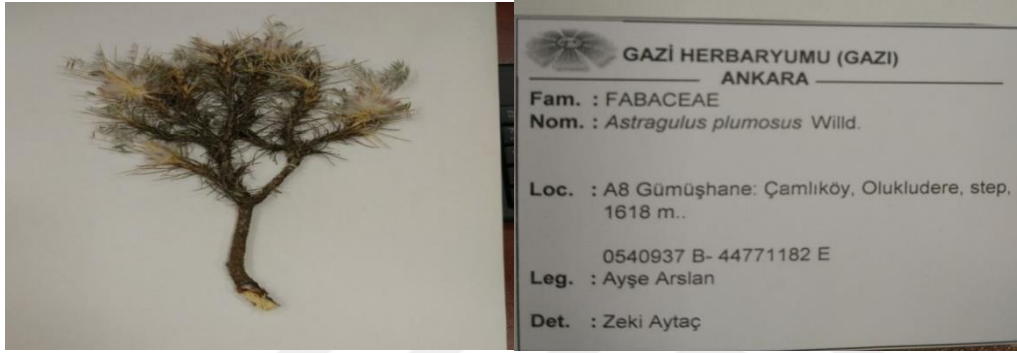
Tablo 2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Satın alınan firma, kodu
Tersiyer bütül hidroksiperoksit (t-BHP)	Sigma Aldrich 19990
Etanol	Sigma Aldrich 32205
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich 41640
Troloks	Sigma Aldrich 238813
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma Aldrich T48885
Potasyum ferrisiyanid [$K_3Fe(CN)_6$]	Merck 244023
Demir (III) klorür ($FeCl_3$)	Merck 157740
Gallik asit	Sigma Aldrich G7384
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck 1.09001.0100
Sodyum karbonat	Sigma Aldrich 13418
Akarboz	Sigma Aldrich PHR1253
Alfa glukozidaz	Sigma Aldrich G5003-100UN
p-nitrofenil α -D glukopiranozit	Sigma Aldrich N1377
Sodyum azid	Sigma Aldrich 71289
Bovine Serum	Sigma Aldrich A2153
Fosfat tamponu	Sigma Aldrich P4417
Askorbik asit (C vitamini)	Merck A5960
2,2-Difenil-1-pikril hidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich D9132
Kuersetin	Merck 1592409
TOS -TAS Kiti	Rel Assay
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich 07102

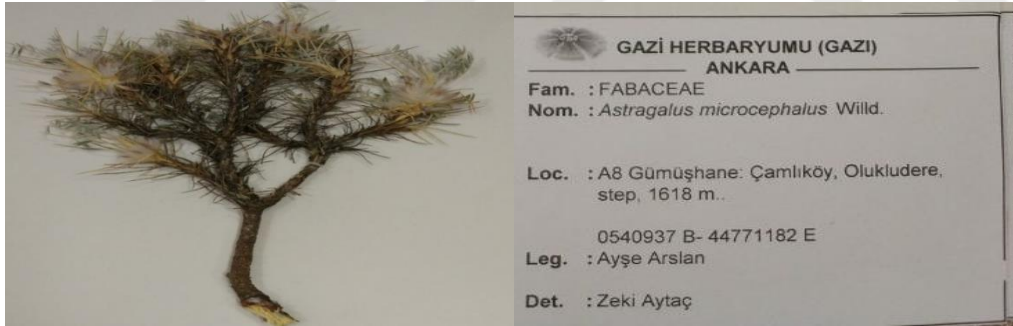
2.2. Metod

2.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması

Astragalus plumosus Willd. ve *Astragalus microcephalus* Willd. bitkileri Gümüşhane Çamlıköy Olukdere mevkinde toplandı. Toplanan bitkiler Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof.Dr. Zeki AYTAÇ tarafından kimliklendirilip Gazi Üniversitesi herbaryum müzesi arşivlerine kaydedildi. Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de bitki örneklerinin herbaryum müzesindeki görselleri verildi.



Şekil 2.1. *Astragalus plumosus*



Şekil 2.2. *Astragalus microcephalus*

Toplanan bitkiler birkaç defa distile su ile yıkanarak filtre kağıtları arasında hava almayacak şekilde GÜNTİBGİM ve Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik laboratuvarında kurutuldu.

2.2.2. Bitkilerin Ekstraksiyonu

Kurutulan bitki örnekleri yaprak, çiçek ve kök kısımlarına ayrılarak değirmen ve blender yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitkiler hassas terazide 1 g ve 0.5 g tartılarak 50 mL'lik falkon tüplerine aktarıldı. Her bir falkon tüpüne 20'şer mL saf su, etanol ve PBS ilave edilerek vortekslendi. Vortekslenen bitki örnekleri karanlık ortamda çalkalayıcı inkübatörde 50°C 150 rpm'de 24 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bitki ekstraktları süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülerek alikotlanıp -20°C'de karanlıkta buzdolabında saklandı. Böylece 50 mg/mL ve 25 mg/mL'lik sulu, etanollü ve PBS'li stok bitki ekstraktları elde edildi.

2.2.3. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.2.3.1. Toplam Polifenol İçerik Tayini

Bu metod;

- Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenir.
- Fosfotungstik asit bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenir.
- Oluşan mavi renk absorbansı ortamdaki aromatik fenolik grubu ile doğru orantılıdır.
- Toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanılır (Çakıroğlu, 2010).

Çözeltilerin Hazırlanması

%20'lik Na₂CO₃ çözeltisi: 2 g Na₂CO₃ tartılıp saf su ile çözünüp üzeri 10 mL'ye tamamlandı.

1:10 Folin Reaktifi: Stok şişeden 250 µL folin alındı ve üzeri 2250 µL saf su ile tamamlandı. Tayin öncesi hazırlanıp taze olarak kullanıldı.

Standartlar: 0.01 g gallik asit tartıldı ve 1 mL saf etanolla çözülerek 10.000 µg/mL'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 µg/mL'lik gallik asit standartları hazırlandı.

Deneyin yapılışı

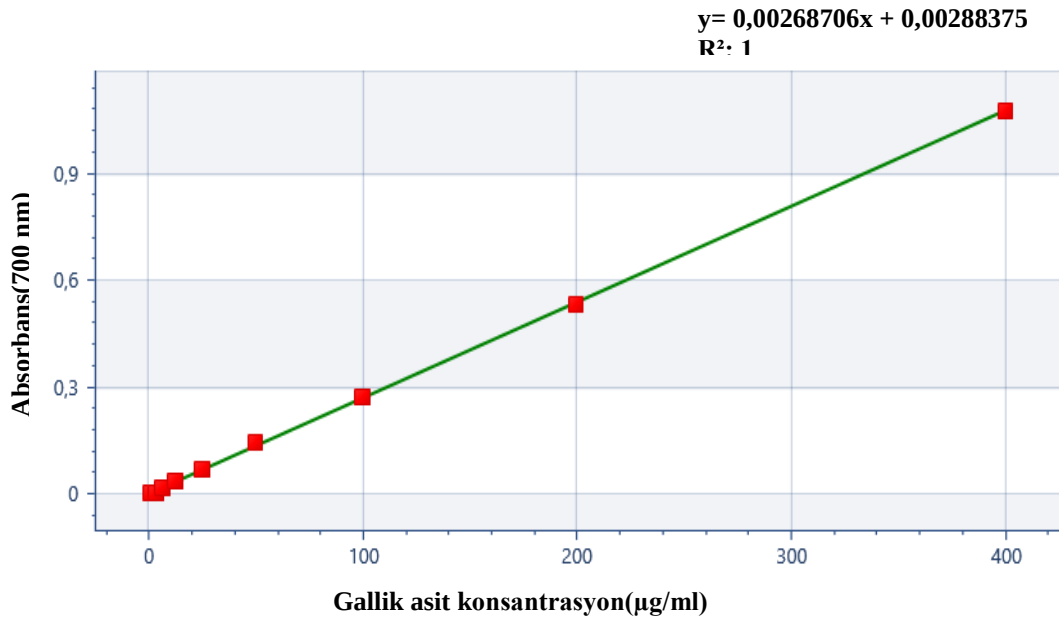
Körler ve ekstraktlar 1:3 oranında seyreltildi

Tablo 2.3'deki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroyetide yapıldı.

Tablo 2.3. Bitki ekstraktlarında toplam polifenol içerik tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su / PBS / Etanol	12.5 µL	-	-
Ekstrakt	-	12.5 µL	-
Standart	-	-	12.5 µL
1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi	62.5 µL	62.5 µL	62.5 µL
%20'lik Na ₂ CO ₃	125 µL	125 µL	125 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edilir.			
700 nm'de mikroyet okuyucu spektrofotometrede absorbanı ölçölür.			

Sonuçlar Şekil 2.3'deki gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak mg/mL olarak hesaplandı. Her örnek için ölçölmler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.3. Gallik asit standart grafiğı

2.2.3.2. Demir (Fe³⁺) İndirgeyici Güç Tayini

Fe³⁺ ferrisiyanür kompleksinin Fe²⁺’ye indirgenmesi esasına dayanır.

Bu metotta;

- Test edilen örneğin sarıdan yeşile dönmesi burada indirgen madde varlığının göstergesidir.
- Oluşan yeşil renk 700 nm’de maksimum absorbans verir.
- Artan absorbans değeri indirgenme kuvvetinin göstergesidir.
- Metotta standart antioksidan bileşik olarak troloks kullanıldı (Çakıroğlu, 2010).

Çözeltilerin Hazırlanışı

0,2 M pH:6.6 fosfat tamponu: 1 adet PBS tableti erlene alındı, üzerine bir miktar saf su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözülmesi sağlandı. Daha sonra pH:6.6’ya ayarlanarak hacmi 200 mL olacak şekilde bir miktar saf su ile tamamlandı.

%1’lik K₃Fe (CN)₆: 0.1 g K₃Fe (CN)₆ tartılıp bir miktar saf su ile çözünüp hacmi 10 mL’ye tamamlandı.

%10’luk TCA: 1 g TCA tartıldı bir miktar saf su ile çözülüp hacmi 10 mL’ye tamamlandı.

%0.1’lik FeCl₃: 0.01 g FeCl₃ tartılıp bir miktar saf su ile çözülüp hacmi 10 mL’ye tamamlandı.

Standartlar: 0.001 g troloks tartıldı 1 mL saf etanolde çözülerek 1000 µg/mL’lik stok elde edildi. 1000 µg/mL’lik stoktan 500,125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9625, 1.953125, 0.9765625 µg/mL’lik troloks standartları hazırlandı.

Deneyin yapılışı

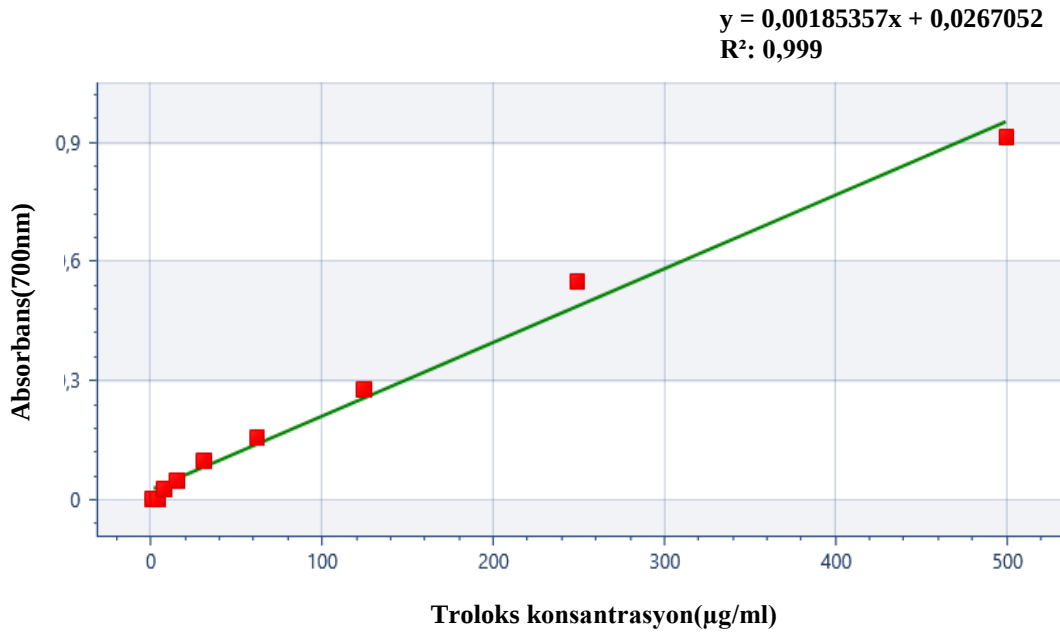
Kör ve ekstraktlar 1:3 oranında seyreltildi.

Deneyin Tablo 2.4’deki pipetlemelerinin ilk altı aşaması 1.5 mL’lik tüplerde sonraki aşamaları ise 96 kuyucuklu mikropleytte gerçekleştirildi.

Tablo 2.4. Bitki ekstraktlarında demir indirgeyici güç tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su/Etanol/PBS	40 µL	-	-
Ekstrakt	-	40 µL	-
Standart	-	-	40 µL
0.2 M pH:6,6 Fosfat tamponu	100 µL	100 µL	100 µL
%1'lik K ₃ Fe (CN) ₆	100 µL	100 µL	100 µL
50 °C' de 20 dakika inkübe edildi ve soğutuldu.			
%10'luk TCA	100 µL	100 µL	100 µL
3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.			
Üstündeki fazlardan 100'er µL alınarak 96 kuyucuklu mikropleytte aktarıldı.			
Saf su	100 µL	100 µL	100 µL
%0.1'lik FeCl ₃	20 µL	20 µL	20 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi.			
700 nm'de mikropleyt okuyucu spektrofotometrede absorbans ölçüldü.			

Sonuçlar Şekil 2.4'deki troloks standart grafiğinden yararlanılarak mg troloks /g ekstrakt troloks eş değeri olarak verildi. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.4. Demir indirgeyici güç troloks standart grafiği

2.2.3.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Astragalus plumosus ve *Astragalus microcephalus* ekstraktlarının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi Yu ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı. DPPH radikali, ticari olarak satın alınan bir radikal olup, 517 nm dalga boyunda maksimum absorbands değeri verir. Antioksidan madde veya maddelerle muamele edildiğinde, DPPH 'den kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbands değerlerinin düşmesine neden olur. Çalışmada satın alınan radikalın 0.1 mM'lık metanolik çözeltisi kullanıldı. *Astragalus plumosus* ve *Astragalus microcephalus* ekstraktları 1:20 oranında seyreltilerek hazırlandı. Negatif kontrol olarak DPPH çözeltisi ve numunelerin çözücülerini kullanıldı. Tablo 2.5' de verilen pipetlemeler yapılarak 30 dk'lık inkübasyon süresinden sonra 517 nm'de mikroyet okuyucuda absorbands değerleri okundu.

Çözeltilerin Hazırlanışı

0.1 mM DPPH çözeltisi: 2 mg DPPH çözeltisi tartıldı ve 50 mL saf etanolde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Bu işlem balon jodede karanlık ortamda yapıldı.

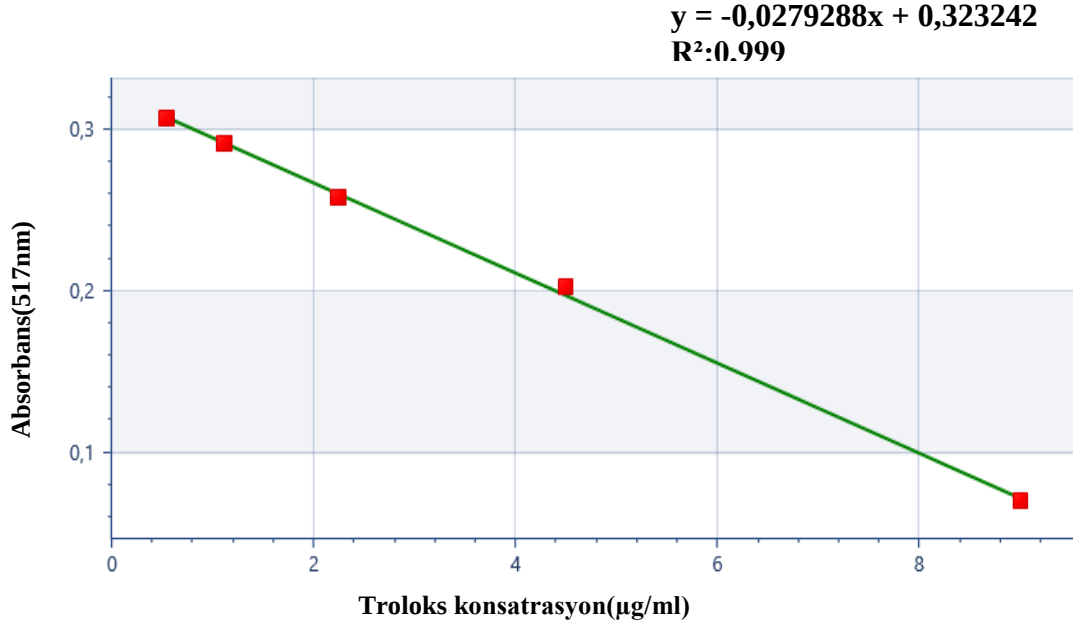
Troloks standartı 25 mg tartıldı ve 1250 µl saf etanolde çözüldü. Hazırlanan stok çözeltiden 9,4.5,2.25,1.25 ve 0.5625 µg/mL olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda hazırlandı ve Tablo 2.5'de verilen pipetlemeler yapıldı.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 2.5. Bitki ekstraktlarında DPPH tayini için yapılan pipetlemeler

	Kontrol	Numune	Standart
Su/PBS/Etanol	125 µL		
DPPH çözeltisi	125 µL	125 µL	125 µL
Ekstrakt		125 µL	
Standart			125 µL
Oda sıcaklığında, karanlık 30 dakika inkübe edildi.			
517 nm'de mikroyet okuyucu spektrofotometrede absorbands ölçüldü.			

Sonuçlar Şekil 2.5'deki troloks standart grafiğinden yararlanılarak mg troloks /g ekstrakt troloks eşdeğeri olarak verildi. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.5. DPPH troloks standart grafiği

2.2.3.4. Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini

Ekstraktlardaki flavonoid içerik, alimünyum klorür kolorimetrik metoduyla belirlenmiştir. Metod prensibi, $AlCl_3$ bileşiğinin flavonlar ve flavonollerin C-3 veya C-5 hidroksil grupları ve C-4 keto grubu ile asitte kararlı kompleks bileşikler oluşturması esasına dayanır. Buna ilaveten $AlCl_3$, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksi grupları ile kompleks bileşik oluşturur. Bu metoda göre standart olarak kuersetin kullanılır. Deney Çakıroğlu'nun tezinden modifiye edilerek yapıldı (Çakıroğlu, 2010)

Çözeltilerin Hazırlanışı

%80'lik etanol: 8mL DMSO hacmi saf su ile 10 mL 'ye tamamlandı.

%10'luk $Al(NO_3)_3$: 1.25g $Al(NO_3)_3$ tartıldı 12.5 mL saf suda çözüldü.

1M KCH_3COO : 1.227 g KCH_3COO tartıldı, 12.5 mL saf suda çözüldü.

Standartlar: 0.01 g kuersetin tartıldı ve 1000 µL saf DMSO'da çözüldü. 10.000 µg/mL'lik stok hazırlandı. 10.000 µg/mL'lik stoktan 100, 50, 25, 12.5, 6.5, 3.25 ve 1.5625 µg/mL'lik kuersetin standartları elde edildi.

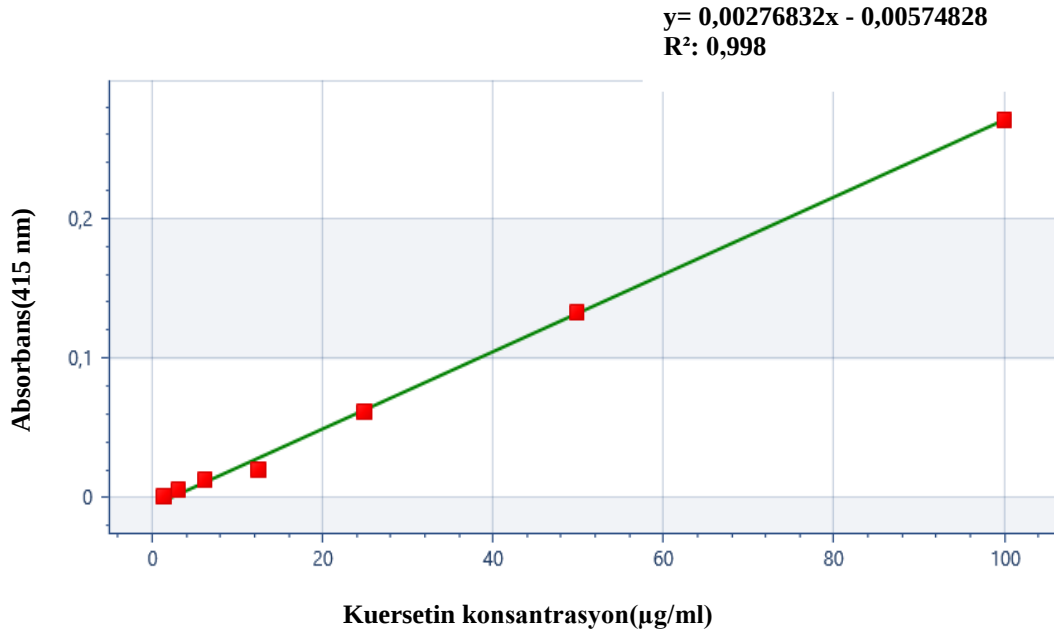
Deneyin yapılışı

Ekstraktlar 1:3 oranında seyreltildi ve Tablo 2.6’da verilen pipetlemeler yapıldı.

Tablo 2.6. Bitki ekstraktlarında toplam flavanoid tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su/Etanol/PBS	20µL	-	-
Ekstrakt	-	20 µL	-
Standart	-	-	20µL
%80’lik Etanol	172 µL	172 µL	172 µL
%10’luk Al (NO ₃) ₃	4 µL	4 µL	4 µL
1M KCH ₃ COO	4 µL	4 µL	4 µL
Oda sıcaklığında karanlıkta 40 dk inkübasyona bırakıldı			
415 nm’de mikropleyt okuyucu spektrofotometrede absorbens ölçüldü.			

Sonuçlar Şekil 2.6’daki kuersetin standart grafiğinden faydalanılarak µg/mL olarak hesaplandı ve mg KE / g ekstrakt şekline aşağıdaki hesaplamayla dönüştürüldü. Her örnek için sonuçlar üç kere tekrarlandı(n=3).



Şekil 2.6. Kuersetin standart grafiği

2.2.4. Ekstraktlarda Antidiyabetik Etkinin İncelenmesi

2.2.4.1. α -Glukozidaz İnhibisyon Testi

Deney Denghan ve Salehi (2016)'nin kullanmış oldukları yöntem modifiye edilerek yapılmıştır.

Çözeltilerin Hazırlanışı

5 mM pNPG (p-Nitrofenil α -glukopiranozit): 0.015 g tartıldı ve 10 mL saf suda çözüldü.

0.1 M Na₂CO₃: 0.05 g Na₂CO₃ tartıldı ve 5 mL saf suda çözüldü.

500 μ g/mL akarboz: 0.005 g akarboz tartıldı ve 1 mL DMSO 'da çözüldü. 5000 μ g/mL akarboz stoğu elde edildi. Stok çözeltiden 100 μ L akarboz alındı ve 900 μ L DMSO 'da çözüldü.

α -glukozidaz enzimi (1U/mL): 100 U/mL'lik stok enzim PBS ile hazırlanmış bovine serum ve sodyum azid çözeltileri içerisinde çözülerek hazırlandı. 100 U/mL'lik stok enzimden 100 μ L alındı ve 900 μ L PBS ve bovine serum ile çözülerek 1 U/mL'lik enzim çözeltisi hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Etanollü ekstraktlar 1:40 oranında seyreltildi. Deney aşamaları Tablo 2.7'de verildiği şekliyle gerçekleştirildi.

Tablo 2.7. α -glukozidaz testi için yapılan pipetlemeler

	Pozitif Kontrol	Kontrol	Kör	Numune
Akarboz	10 μ L			
Ekstrakt				10 μ L
Enzim	50 μ L	50 μ L		50 μ L
Su/DMSO/Etanol			60 μ L	
PBS+BSA	10 μ L	20 μ L	10 μ L	10 μ L
25°C 'de 10 dk inkübasyon				
pNPG	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
25°C'de 5 dk inkübasyon				
Na ₂ CO ₃	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L
405 nm' de mikropleyt okuyucu spektrofotometrede absorbans ölçüldü.				

Deneyde pozitif kontrol olarak antidiyabetik etkisi bilinen akarboz kullanıldı. Her örneğin Şekil 3.1’de %inhibisyon değerleri verildi. Her örnek için ölçümler 4 kere tekrarlandı (n=4).

2.2.5. Eritrosit Hemoliz İnhibisyonu

2.2.5.1. Eritrosit Örneklerinin toplanması

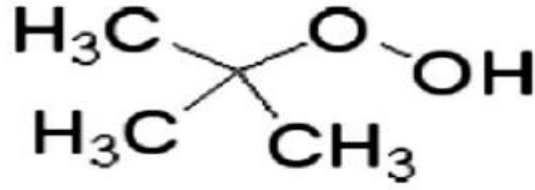
10 gönüllüden (sigara, alkol, ilaç kullanmayan, kronik rahatsızlığı olmayan, ağır egzersiz yapmayan) onam formu eşliğinde EDTA’lı tüplere kan örneği toplandı. Toplanan kan örnekleri Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik araştırma laboratuvarında santrifüjlendi.

2.2.5.2. Eritrosit Paketlerinin Hazırlanması

Eritrosit örneklerinin her biri eşit miktarda hemogram tüplerine aktarıldı. Eritrositlerin ayrıştırılması için eritrositler 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen kanların üstte kalan süpernatant kısımları pastör pipeti ile uzaklaştırılarak 0,2 M pH ‘ı 7.4 olan fosfat tamponu (PBS) ile yıkama yapıldı. Eritrositlerin PBS ile eşit miktarda yıkanabilmesi için hemogram tüpleri yavaşça karıştırıldı. Yıkama işlemine süpernatant kısmında berraklık elde edilinceye kadar devam edildi.

2.2.5.3. Eritrosit Örneklerinin Hasara Uğratılması

Eritrosit örneklerini hasara uğratmak için t-BHP çözeltisi kullanıldı. Eritrosit örnekleri için 1 M’lık t-BHP çözeltisinden 0,4 M hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilen deney basamaklarında ifade edilmiştir. t-BHP organik bir hidroksiperoksittir. Oksidatif hücre hasarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılır ve açık formülü Şekil 2.7 de verilmiştir. Organik hidroksiperoksitler peroksil radikallerinden bir hidrojen atamonun çıkarılmasıyla ya da alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi sonucunda oluşurlar. Organik hidroksiperoksit olan t-BHP molekülü sonradan diğer alkoksil radikallerine veya peroksil radikallerine ayrışabilir. Bu ayrışma reaksiyonları metal iyonları ve metal iyonlarının kompleksleri vasıtasıyla gerçekleşir. Bu durumun oluşması lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hızlandırabilir. t-BHP molekülünden kaynaklanan genotoksisite; bir geçiş metali aracılığıyla gerçekleşen reaksiyon ile H₂O₂ gibi farklı reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle sonuçlanan bir süreçtir (Lima vd., 2006; Turan, 2011).



Şekil 2.7. t-BHP'nin açık formülü

Deney Aşamaları

Çözeltilerin Hazırlanması

0.2 M pH: 7.4 fosfat tamponu: Kan örneklerinin yıkanması, t-BHP, ekstraktların ve C vitaminin hazırlanması amacıyla kullanıldı. 1 PBS tableti erlen içine alındı ve bir miktar saf su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmesi sağlandıktan sonra pH: 7.4'e ayarlanarak hacmi 200 mL'ye tamamlandı.

t-BHP çözeltisi : Saf t-BHP 'den 27 µL alındı ve 9973 mL PBS ile çözülerek 1 M'lık t-BHP elde edildi. Daha sonra 1 M'lık t-BHP'den 400 µl alınarak üzeri 600 µl PBS ile tamamlanarak 0,4 M'lık t-BHP elde edildi.

C vitamini: 0.005 g C vitamini tartıldı ve 1 mL PBS ile çözülerek 5000 µg/mL 'lik stok C vitamini hazırlandı. Daha sonra stoktan 500 µg/mL'lik C vitamini hazırlanarak deneyde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

50 mg/mL olarak hazırlanan *A. plumosus* ve *A. microcephalus* ekstraktları PBS ile seyreltilerek 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 mg/ mL olacak şekilde hazırlandı.

Çözeltilerden PBS hariç hepsi her gün taze olarak hazırlandı. PBS ise buzdolabında +4 °C 'de saklandı.

Tablo 2.8. Hemoliz inhibisyonu için yapılan pipetlemeler

	Eritrosit	Ekstrakt	PBS	t-BHP
Negatif Kontrol	300 µL	-	200 µL	-
Pozitif Kontrol	200 µL	-	200 µL	100 µL
A.p 12.5mg/mL	200 µL	200 µL	100 µL	-
A.p 12.5mg/mL	200 µL	200 µL	-	100 µL
A.p 6.25mg/mL	200 µL	200 µL	100 µL	-
A.p 6.25mg/mL	200 µL	200 µL	-	100 µL
A.p 3.125mg/mL	200 µL	200 µL	100 µL	-
A.p 3.125mg/mL	200 µL	200 µL	-	100 µL
A.m 12.5mg/mL	200 µL	200 µL	100 µL	-
A.m 12.5mg/mL	200 µL	200 µL		100 µL
A.m 6.25mg/mL	200 µL	200 µL	100 µL	-
A.m 6,25mg/mL	200 µL	200 µL		100 µL
A.m 3.125mg/mL	200 µL	200 µL	100 µL	-
A.m 3.125mg/mL	200 µL	200 µL	-	100 µL
C Vitamini	200 µL	200 µL	-	100 µL

Deneyin Yapılışı

Çalışma için oluşturulmuş eritrosit örneklerinin yoğunluğunun çok yüksek olmasından dolayı 0.2 M pH=7.4 olan fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltilerek fosfat tamponun her bir eritrosit hücresi ile karışmış olması için eritrositlerin hemogram tüpleri içerisinde homojenizasyonu sağlandı. 3 farklı ekstrakt konsantrasyonu hazırlandı ve 6 farklı grup oluşturuldu. Her bir hasarlayıcı grup için kontrol grubu oluşturuldu. Antioksidan aktivitesi yüksek olarak bilinen C vitamini 500 µg/mL konsantrasyonunda hazırlandı. Çalışma için deney prosedürü aşağıdaki gibi tasarlandı. Tasarlanan deney grupları Tablo 2.8’de gösterilmiştir.

1. Çalışma için uygun grupların oluşturulmasının ardından ilk olarak ekstraktla muamele edilen kan örnekleri 37°C ‘de 30 dk inkübasyona bırakıldı.

2. İnkübasyon sonrasında tüplere t-BHP ilave edilerek 37°C 'de 3 saat boyunca inkübe edildi.
3. 3 saatin sonunda inkübasyondan alınan tüplerin her birine 5 mL PBS ilave edilerek tüpler nazikçe sallanarak 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
4. Santrifüj işleminden sonra sırasıyla her bir örneğin sıvı kısmı alınarak 540 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü (Okoko ve Ere, 2012).
5. Deney sırasında el hassasiyetine oldukça dikkat edildi. Her bir grup için deney 3 kere tekrarlandı (n=3). Kör olarak PBS kullanıldı.

Deney sonuçları % hemoliz inhibisyonu olarak Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 'de verilmiştir.

2.2.6. Serum Oksidan Antioksidan Durum Tayini

2.2.6.1. Serum Örneklerinin Toplanması

10 gönüllüden (sigara, alkol, ilaç kullanmayan, kronik rahatsızlığı olmayan, ağır egzersiz yapmayan) onam formu eşliğinde biyokimya tüplerine serum örnekleri toplandı. Toplanan serum örnekleri Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik araştırma laboratuvarında santrifüjlendi.

2.2.6.2. Serum Örneklerinin Hasara Uğratılması

Serum örneklerini hasara uğratmak için 0,1 M'lık t-BHP çözeltileri hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanışı aşağıda deney basamaklarında verilmiştir.

Deney Aşamaları

0.2 M pH: 7.4 fosfat tamponu: t-BHP, ekstraktların ve C vitaminin hazırlanması amacıyla kullanıldı. 1 PBS tableti erlen içine alındı ve bir miktar saf su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmesi sağlandıktan sonra pH: 7.4'e ayarlanarak hacmi 200 mL'ye tamamlandı.

50 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan *A. plumosus* ve *A. microcephalus* ekstraktları seyretilmeden kullanıldı.

Hazırlanan 1 M'lık t-BHP çözeltisinden 0.4 M, 0.2 M ve 0.1 M olacak şekilde seri dilüsyon yapılarak 0.1 M 'lık t-BHP çözeltisi kullanıldı.

Pozitif kontrol olarak kullanılan C vitamini 0.005 g tartıldı ve 1 mL PBS ile çözülerek elde edilen 5000 µg/mL 'lik stok çözeltisinden 500 µg/mL'lik C vitamini hazırlandı. Biyokimya tüpüne toplanan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası elde edilen serumlar 1,5 mL'lik tüplere alındı ve her iki deney içinde aşağıda verilen Tablo 2.9'daki pipetlemeler yapıldı. Serumda kullanılan doz miktarları antioksidan analizlerinde kullanılan dozlara göre ayarlandı.

Tablo 2.9. TAS ve TOS için oluşturulan deney grupları

	Serum	PBS	Ekstrakt	t-BHP
1.grup	250µL	300µL	-	-
2.grup	250µL	250µL	-	50µL
3.grup	250µL		250µL	50µL
4.grup	250Ll		250µL	50µL
5.grup	250µL		250µL	50µL

1.grup: Serum ve PBS (Negatif kontrol), 2.grup: Serum, PBS ve t-BHP (Pozitif kontrol), 3.grup: Serum, A.p ve t-BHP, 4.grup: Serum, A.m ve t-BHP, 5.grup: Serum, C vitamini ve t-BHP şeklinde gruplar oluşturuldu.

Toplam Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam oksidan statü düzeyi (TOS), Erel tarafından geliştirilen Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü (Erel, 2005). Kalibrator olarak H₂O₂ kullanıldı. Sonuçlar µmol H₂O₂ eşdeğeri /lt olarak ifade edildi.

Deneyin yapılışı

Hasarlı deney gruplarının oluşturulmasının ardından deneyin aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibi yapılmıştır;

1. Ekstraktla muamele edilen serum örnekleri 37°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından her bir gruba t-BHP eklenerek 37°C ‘de 30 dk süresi boyunca inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında deneyin diğer aşamaları 96 kuyucuklu mikropleytte gerçekleştirildi. Her bir pleyte 25 µL kör, hasarlı serum ve standart pipetlendi.
3. Her bir kuyucuğa 160 µL Reaktif 1 pipetlendi.
4. Eşit bir şekilde karışım sağlandıktan sonra 30 sn’lik inkübasyon sonunda 530 nm ‘de mikropleyt okuyucuda 1.okuma yapıldı.
5. Daha sonra her bir kuyucuğa 9 µL Reaktif 2 pipetlendi.
6. Karışım sağlandıktan sonra 10 dk’lık inkübasyonun ardından 530 nm’de mikropleyt okuyucuda 2. okuma yapıldı.

Absorbans ölçümü yapıldıktan sonra TOS değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

A2-A1= ΔAbs örnek ya da standart

A2= İkinci absorbans okuması

A1= Birinci absorbans okuması

10 µmol H₂O₂ Eq /L = Standartın konsantrasyonu

$$\text{Sonuç} = (\Delta\text{Abs örnek}) / (\Delta\text{Abs standart}) \times 10 \mu\text{mol/L}$$

Toplam Antioksidan Seviyenin Belirlenmesi

Örneklerin total antioksidan status düzeyi (TAS), Erel tarafından geliştirilen Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü (Erel, 2004). Kalibratör olarak Troloks kullanıldı. Sonuçlar mmol Troloks eşdeğeri/L olarak ifade edildi. Hasarlı deney gruplarının oluşturulmasının ardından deney aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı;

1. Ekstraktla muamele edilen serum örnekleri 37°C’de 10 dk süresi boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından her bir gruba t-BHP eklenerek 37°C ‘de 30 dk süresi boyunca inkübe edildi. Sonrasında aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı.
2. İnkübasyon sonrasında deneyin diğer aşamaları 96 kuyucuklu mikrapleytte gerçekleştirildi. Her bir pleyte 15 µl kör, hasarlı serum ve standart pipetlendi.
3. Her bir kuyucuğa 250 µL Reaktif 1 pipetlendi.

4. Eşit bir şekilde karışım sağlandıktan sonra 30 sn'lik inkübasyon sonunda 660 nm 'de mikropleyt okuyucuda 1.okuma yapıldı.
5. Daha sonra her bir kuyucuğa 9 µL Reaktif 2 pipetlendi.
6. Karışım sağlandıktan sonra 5 dk'lık inkübasyonun ardından 660 nm'de mikropleyt okuyucuda 2. okuma yapıldı.

Absorbans ölçümü yapıldıktan sonra TAS değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve TAS sonuçları µmol Trolox equivalent/L cinsinden verildi.

A2-A1= ΔAbs örnek ya da standart

A2= İkinci absorbans okuması

A1= Birinci absorbans okuması

Sonuç = [(ΔAbsPBS)- (ΔAbs Örnek)] /[(ΔAbsPBS)-(ΔAbs Standart)] mmol/L

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde olarak ifade edilmesidir. OSİ hesabı yapılırken TAS testinin mmol birimi TOS testindeki µmol birimine çevrildi (Erel, 2015).

$$OSİ = (TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / [(TAS, \mu\text{mol Troloks eşdeğeri/L}) \times 100]$$
(Ayçiçek vd., 2005).

2.2.7. İstatiksel Analiz

İstatistik analizleri yapılarak tüm sonuçların aritmetik ortalaması ve standart sapmaları verildi. p değerleri One way ANOVA testine, grup içi değerlendirmeler ise Tukey testine göre verildi. SPSS 16.0 paket programı kullanılarak analizler yapıldı.

3. BULGULAR

Farklı analizlerde kullanılmak üzere *Astragalus microcephalus* ve *Astragalus plumosus* ekstraktları su, PBS ve etanol olmak üzere üç farklı çözücü ile hazırlandı.

3.1. Antioksidan Analiz Sonuçları

Antioksidan analizleri ile ilgili yapılan deney sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 3.1. *Astragalus plumosus* bitki ekstraktı antioksidan analiz sonuçları

	Grup		
	PBS ekstraktı	Su ekstraktı	Etanol ekstraktı
Demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) (mg TE/g)	13.0±0.084	11.5±0.075 ^b	5.82±0.677 ^a
Toplam polifenol içerik (mg GAE/g)	12.8±0.425	12.2±0.314	13.9±0.407 ^c
Toplam flavonoid içerik (mg KE/g)	4.19±0.445	3.90±0.094	3.30±0.242 ^c

GAE: Gallik asit eşdeğeri, **KE:** Kuersetin eşdeğeri, **TE:** Trolox eşdeğeri

PBS grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001, ^b p<0.01, ^c p<0.05 anlamlı kabul edildi.

Demir indirgeyici antioksidan güç: PBS ile su p=0.007, Etanol p=0.0001

Toplam polifenol içerik: PBS ile su p=0.279, Etanol p=0.028

Toplam flavonoid içerik: PBS ile su p=0.506, Etanol p=0.025

Tablo 3.2. *Astragalus plumosus* bitki ekstraktına ait DPPH sonuçları

	Gruplar			
	Troloks	PBS ekstraktı	Su ekstraktı	Etanol ekstraktı
DPPH	77.0±0.001	14.6±0.862 ^a	15.5±1.11 ^a	10.9±0.344 ^a

Trolox grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001 anlamlı kabul edildi.

DPPH: Troloks ile PBS p=0.0001, su p=0.0001, Etanol p=0.000

Tablo 3.3. *Astragalus microcephalus* bitki ekstraktı analiz sonuçları

	Gruplar		
	PBS ekstraktı	Su ekstraktı	Etanol ekstraktı
Demir indirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) (mg TE/g)	13.6±0.697	13.8±0.879	7.65±0.249 ^a
Toplam polifenolik içerik (mg GAE/g)	13.9±0.493	14.2±0.492	14.8±1.33
Toplam flavanoid içerik (mg KE/g)	3.57±0.278	6.18±0.216 ^a	4.80±0.176 ^b

PBS grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001, ^b p<0.01 anlamlı kabul edildi.

Demir indirgeyici antioksidan güç: PBS ile su p=0.919, Etanol p=0.0001

Toplam polifenolik içerik: PBS ile su p=0.948, Etanol p=0.524

Toplam flavonoid içerik: PBS ile su p=0.0001, Etanol p=0.001

Tablo 3.4. *Astragalus microcephalus* bitki ekstraktına ait DPPH sonuçları

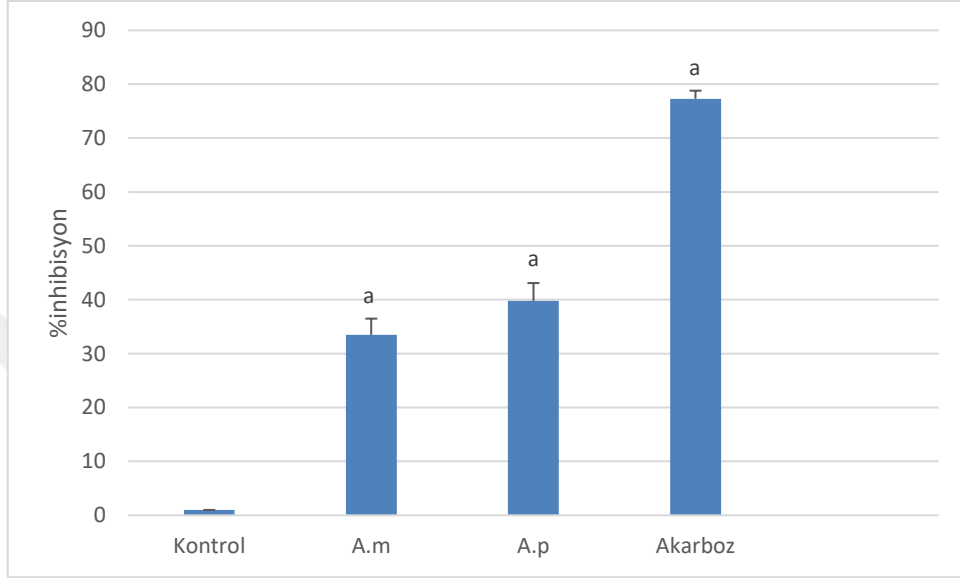
	Gruplar			
	Troloks	PBS ekstraktı	Su ekstraktı	Etanol ekstraktı
DPPH	77.0±0.00	19.5±0.319 ^a	18.5±0.211 ^a	14.2±0.699 ^a

Trolox grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001 anlamlı kabul edildi.

DPPH: Troloks ile PBS p=0.0001, su p=0.0001, Etanol p=0.0001

3.2. α -Glukozidaz İnhibisyon Sonuçları

Her iki bitki ekstraktının α -glukozidaz enzimini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görüldü. (p=0.0001)



Şekil 3.1. α -glukozidaz % inhibisyon

A.m: *Astragalus microcephalus* bitki ekstraktına ait % inhibisyon sonucu

A.p: *Astragalus plumosus* ekstraktına ait % inhibisyon sonucu

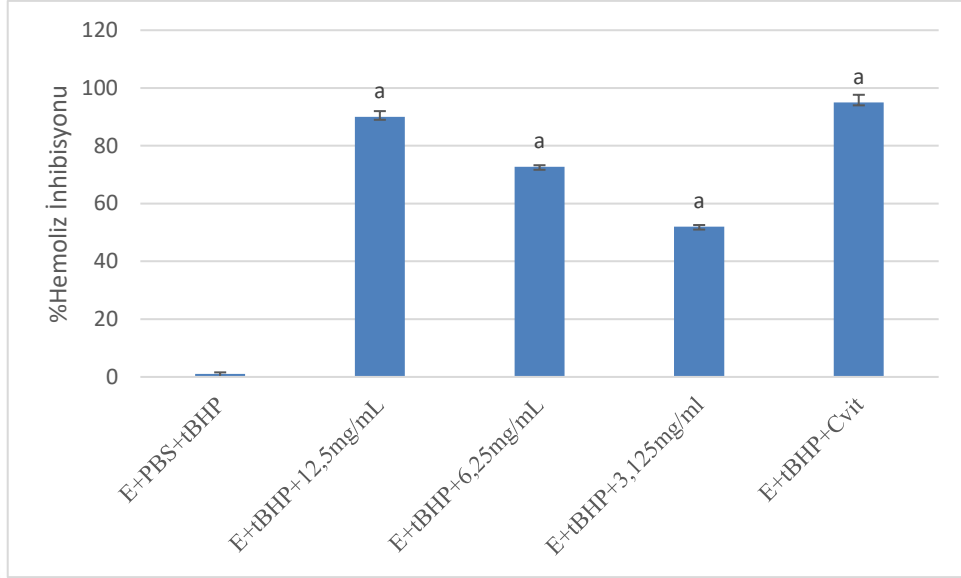
Kontrol grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001 anlamlı kabul edildi.

3.3. Hemoliz İnhibisyon Sonuçları

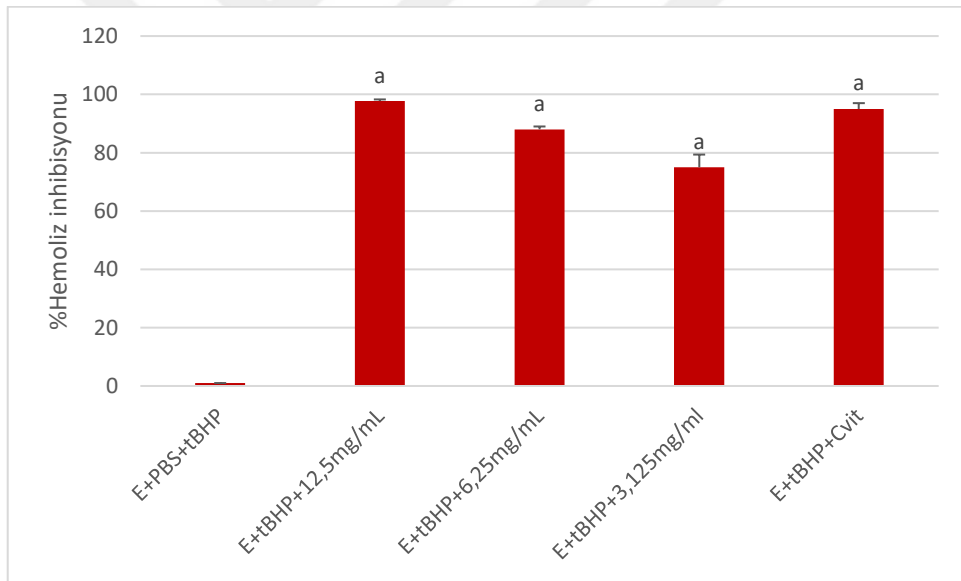
Her iki bitki ekstraktının farklı konsantrasyonları hemolizi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görüldü. (p=0.0001)

E+PBS+tBHP grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001 anlamlı kabul edildi.

Bitki ekstraktlarını hazırlamada kullanılan PBS çözeltisi kan örneklerini hasara uğratmamıştır.



Şekil 3.2. *Astragalus microcephalus* ekstraktında % hemoliz inhibisyonu



Şekil 3.3. *Astragalus plumosus* ekstraktında % hemoliz inhibisyonu

3.4. TAS-TOS Ve OSİ Sonuçları

Tablo 3.5. TAS,TOS,OSİ değerleri

	Gruplar				
	S+PBS+tBHP	S+PBS	S+A.p+tBHP	S+A.m+tBHP	S+Cvit+tBHP
TAS (mmolTrolox Eq/L)	1.02±0.087	1.06±0.110	1.41±0.120 ^c	1.44±0.114 ^c	1.71±0.148 ^a
TOS (µmol H ₂ O ₂ Eq/L)	38.6±0.540	6.69±0.440 ^a	25.8±0.798 ^b	24.7±5.23 ^b	20.3±2.24 ^a
OSI	3.80±0.343	0.633±0.064 ^a	1.83±0.265 ^a	1.71±0.233 ^a	1.19±0.079 ^a

S=Serum

S+PBS+tBHP grubu ile karşılaştırılarak ^a p<0.001, ^b p<0.01, ^cp<0.05 anlamlı kabul edildi.

4. TARTIŞMA

Oksidatif stres birçok hastalığın etkeni olup, hastalıklarda oluşan olumsuz etkilerin önlenmesi için doğal kaynaklara olan ihtiyacı artırmaktadır. Bu durum sentetik maddelerin kullanımının azalmasına ve bu sentetik maddelerin yerine bitkisel kaynak bakımından zengin olan doğal ürünlerin tercih edilmesine sebep olmuştur (Okoko ve Ere, 2012).

Sentetik maddelerin ciddi olumsuz yan etki oluşturmaları nedeniyle doğal kaynaklı bitkilerin tıbbi alanda kullanılması gerektiği pek çok alanda vurgulanmıştır (Rajesh vd., 2013).

Bitkilerin içerdikleri fenolik asitler ve flavonoid gibi çeşitli bileşikler bitkilere antioksidan ve farmakolojik özellikler kazandırmaktadır. Bu durum son yıllarda bilim dünyasının doğal kaynaklı bitkilere olan ilgisini artırmış ve bitkilerin biyolojik, farmakolojik ve medikal özelliklerinin geniş çapta ve sürekli olarak araştırılmasına sebep olmuştur (Ajila ve Prasada, 2008; Balkan, 2017). Bu doğal kaynaklı bitkilerin arasında *Astragalus* türleri de yer almaktadır. Takson açısından dünyanın en büyük cinsi olan *Astragalus* 1700'lü yıllardan beri halk hekimliğinde tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Barneby, 1964). *Astragalus* cinsi büyük bir aile olmasına rağmen, bu cinsin türlerinin antioksidan yeteneği ile ilgili sadece birkaç çalışma bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda *Astragalus* cinsine ait en çok çalışılan türün *Astragalus membranaceus* olduğu bildirilmiştir (Agyemang vd., 2013).

Yapılan literatür taramalarında *Astragalus plumosus* ve *Astragalus microcephalus*'un antioksidan aktiviteleri ile ilgili çalışma bulunamamıştır. Fakat cinsin farklı türleri ile ilgili antioksidan çalışmaları literatürde mevcuttur. Yapmış olduğumuz çalışmada *Astragalus plumosus* ve *Astragalus microcephalus* bitkilerinin yaprakları kullanılarak, yaprak ekstraktları 3 farklı çözücü (su, etanol ve PBS) ile hazırlandı ve bu ekstraktların antioksidan aktiviteleri belirlendi. Çalışmış olduğumuz bitkilerin antioksidan analiz sonuçları Tablo 3.1, Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'de verilmiştir.

Arumugam ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Astragalus ponticus* bitkisinin yaprak, çiçek, gövde ve köklerinin metanollü ekstraktlarında antioksidan aktivitelerini belirlemişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada bitkinin yaprak ekstraktının toplam polifenol içeriğinin $26,34 \pm 0.50$ mg GAE/g olduğu bildirilmiştir (Arumugam vd., 2018).

Astragalus ponticus bitkisinin yaprak ekstraktının toplam polifenol içeriği bizim çalışmış olduğumuz *A. plumosus* ve *A. microcephalus* yaprak ekstraktlarından daha fazla olduğu, çiçek ve gövde ekstraktlarının toplam polifenol içeriğinin bizim bitki ekstraktlarımızın toplam polifenol içeriğinden daha az olduğu tespit edilmiştir. Keskin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Astragalus gymnalocepias* ve *Astragalus diphtherites* ekstraktlarının farklı çözücülerdeki antioksidan içerikleri saptanmıştır. *Astragalus gymnalocepias* bitkisinde en fazla toplam polifenol içeriği, kökte hekzan ve etil asetat sırasıyla (32.33 ± 1.52 , 35.83 ± 1.75 µg GAE/mg) olarak, gövde de ise aseton ve metanol sırasıyla (42.33 ± 2.75 , 54.66 ± 2.25 µg GAE/mg) olarak bulmuşlardır (Keskin vd., 2009). Keskin ve ark. çalışmış oldukları bitki ekstraktlarının toplam polifenol içeriklerinin bizim bitki ekstraktlarımızın toplam polifenol içeriklerinden daha az olduğu tespit edilmiştir. Pereira ve arkadaşlarının *Fabaceae* familyasına ait *Copaifera multijuga* türüyle ilgili yapmış oldukları çalışmada türün kök kabuğundan elde ettikleri etanolik ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan içeriklerini tespit etmişlerdir. *C.multijuga* bitkisinin etanolik ekstraktında toplam polifenol içerik miktarını 643.43 mg GAE/g ekstrakt, bitkinin etil asetat ekstraktının toplam polifenol içerik miktarını ise 187.21 mg GAE/g ekstrakt olarak bildirmişlerdir (Pereira vd. ,2018). Pereira ve ark. yapmış oldukları çalışmada bitki ekstraktlarının toplam polifenol içeriklerinin bizim bitki ekstraktlarımızın toplam polifenol içerik miktarlarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Pereira ve ark. yapmış oldukları çalışmada *Fabaceae* familyasına ait *C. multijuga* bitkisinin etil asetat ekstraktının toplam flavanoid içerik miktarını 8.60 mg KE/g, etanolik ekstraktının toplam flavonoid miktarını ise 11.53 mg KE/g ekstrakt olarak bildirmişlerdir (Pereira vd., 2018). Pereira ve ark. çalışmış oldukları bitkinin ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriklerinin bizim bitkilerimizin ekstraktlarındaki toplam flavanoid içeriklerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *Astragalus gymnalocepias* ve *Astragalus diphtherites* ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri gövde de etil asetat ve aseton sırasıyla (77.67 ± 2.41 , 80.15 ± 0.33 µg KE/mg) kökte ise metanol ve etil asetat sırasıyla (11.20 ± 0.14 , 14.01 ± 0.10 µg KE/mg) olarak bildirilmiştir (Keskin vd., 2009). Keskin ve ark. bitki ekstraktlarının toplam flavonoid içeriklerinin bizim bitki ekstraktlarımızın toplam flavonoid içerikleri ile benzerlik göstermediği tespit edilmiştir.

Arumugam ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Astragalus ponticus* bitkisinin demir indirgeyici güç miktarının yaprakta 59.79 ± 4.34 mg TE/g olduğu bildirilmiştir (Arumugam vd., 2018). Bitkilerimiz yapılan antioksidan çalışmaları ile karşılaştırıldığında

antioksidan miktarları bakımından farklıklar tespit edilmiştir. Bunun sebebinin yapılan ekstraksiyon yöntemi farklılığından ya da farklı çözücülerin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Carvalho ve arkadaşlarının *Fabaceae* familyasına *B. pulchella* bitkisinin etanollü ekstraktının % antioksidan aktivitesi 17.57 ± 0.89 , sulu ekstraktının ise 13.10 ± 0.16 olarak bildirmişlerdir (Carvalho vd., 2018). Bu çalışma ile karşılaştırma yapıldığında bitkilerimizin DPPH aktivitesinin *B. pulchella* bitkisinin DPPH aktivitesi ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Diyabet, karbohidrat, yağ metabolizmasında bir bozulma ile karakterize edilen karmaşık bir hastalıktır (Klein vd., 2007). Günümüzde 366 milyon insan diyabetten etkilenirken, bu sayının 2050 yılında 552 milyona yükselmesi beklenmektedir (Whiting, 2011). Diyabetteki artışa bağlı olarak hastalıkların tedavisine yönelik çalışmaların ortaya çıkması büyük önem arz etmektedir. Bu stratejilerin arasında en çok kabul gören anahtar enzimlerin inhibisyonudur. Anahtar enzim inhibisyonu teorisine göre hastalık seyrinde rol oynayan anahtar enzimlerinin inhibe edilmesi sağlanarak hastalıktan kaynaklanabilecek etkiler hafifletilebilir (Murray vd., 2013). Karbohidrat metabolizmasının temel enzimleri α -amilaz ve α -glukozidaz olup bu enzimlerin faaliyet göstermesi sonucunda kan glukoz seviyesi yükselmektedir. Diyabette kan glukoz seviyesindeki bu yükselmenin engellenerek kontrol altında tutulabilmesi için bu enzimlerin inhibe edilmesi gerekmektedir (Etxeberria vd., 2012). α -glukozidaz inhibitörleri, ince bağırsakta karbohidratın parçalanmasını geciktirir ve diyabetten muzdarip bir kişide postprandiyal kan glukozun azaltılmasını sağlar (Kwon vd., 2007).

Çalışmamızın kapsamında *A. plumosus* ve *A. microcephalus* bitkilerinin etanollü yaprak ekstraktlarının α -glukozidaz inhibisyon kapasiteleri spektrofotometrik metotla araştırılarak glukozidaz inhibisyonu bakımından en güçlü bitki özütünün Şekil 3.1’de verilen *A. plumosus* 39.8 ± 3.30 olarak tespit edildi.

Yin ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *Astragalus membranaceus*’un çeşitli bölümlerinin antidiyabetik etkilerini araştırmışlardır ve etanollü kök ekstraktlarının α -glukozidaz inhibisyonun $\%49.71 \pm 1.01$ olarak bildirmişlerdir (Yin vd., 2009). *A. membranaceus* bitkisinin kök ekstraktının α -glukozidaz inhibisyonun bizim bitkilerimizin yaprak ekstraktlarının α -glukozidaz inhibisyonundan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın oluşması bitkilerin farklı ekstraksiyon yöntemi ve farklı ekstrakt kısımlarından hazırlanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda

Astragalus polisakkaritleri, tip 2 diyabetik sıçanların kan şekerini ve serum trigliserit, karbohidrat ve düşük yoğunluklu lipoprotein içeriğini önemli ölçüde azaltabilirken, yüksek serum lipoprotein seviyelerini önemli ölçüde artırabilir. Tip 2 diyabetik sıçanların insülin direncini azaltabilir ve vücut yağ metabolizması bozukluklarını düzeltebilirler (Liu ve Guo, 2007). Bununla birlikte, *Astragalus membranaceus*'dan izole edilen izoflavonlar, adiposit farklılaşmasını teşvik etmenin yanı sıra PPAR α ve PPAR γ 'nin in vitro aktivasyonu yoluyla iyi bir anti-hiperglisemik iyileşme gösterdiği tespit edilmiştir. *Astragalus membranaceus*'un birçok çeşidinin güçlü bir antihiperglisemik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Güçlü antihiperglisemik aktivitesine sahip olması polisakkarit ve izoflavonlar açısından zengin içeriğe sahip olmasına dayanır (Fu vd., 2014). Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Astragalus* polisakkaritinin insülin dirençli iskelet kasındaki insülin sinyalinin bir bölümünü düzenleyebileceğini ve tip 2 diyabetin tedavisi için potansiyel bir insülin duyarlılığı olabileceğini göstermiştir (Liu vd., 2009). Zhao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Astragalus* polisakkaritinin, tip I diabetes mellitus farelerinin kasındaki galektin-1 ekspresyonunu düzenleyebildiğini bulmuşlardır. Saponinler ve astragalosid IV, sıçanlarda streptozotosin ile uyarılan diyabetlerde periferik nöropatinin ilerlemesine karşı koruyucu etkiler gösterebileceğini ileri sürmüşlerdir (Zhao vd., 2013). Motomura ve arkadaşlarının astragaloside V ile yapmış oldukları çalışmada sığır serum albümini inkübasyonu sırasında N- (karboksimetil) lisin ve pentosidin oluşumunu inhibe ettiği sonucuna ulaşmışlardır. Bununla birlikte bu bileşiğin riboz ile ileri glikasyon son ürünlerini inhibe ederek klinik diyabetik komplikasyonun önlenmesi için potansiyel olarak yararlı bir strateji olabileceğini düşündürmektedir (Motomura vd., 2009).

Çalışmış olduğumuz bitki türlerinin α -glukozidazı inhibe etme özelliği sayesinde bu bitkilerin andiyabetik ilaç geliştirme çalışmalarında potansiyellerinin olabileceği düşünülmektedir.

Eritrositlerde oksidatif stres amaçlı kullanılan ekzojen kaynaklı radikaller H₂O₂, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorit (AAPH), tersiyer bütül -hidroksiperoksit (t-BuOOH/t-BHP), DPPH ve HCl olduğu bildirilmiştir. Ekzojen kaynaklı radikaller ile yapılan çalışmalarda oksidatif hasar belirleyicisi olarak ölçülen parametrelerden MDA düzeyinde artış, hemoliz değerlerindeki artış ve GSH değerlerinde azalış ortak olarak belirlenen parametrelerdir. Bu sonuçlar göze alınarak oksidatif stresin oluşumunu ekzojen kaynaklı radikallerin tetiklediği söylenebilir (Balkan, 2017). Birçok hastalığın etmeni olan oksidatif stresin engellenebilmesi için tıbbi bitkilerin kullanılması kaçınılmaz olmuştur.

Yu ve arkadaşlarının *A. mongholicus* Bunge türünün bazı flavanoidlerinin ve saponinlerinin anti-oksidatif aktivitelerini çalışmışlardır. Örneğin, formononetin, kalikozin, kalikozin-7-O-y-D glukozit, in vitro olarak 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikallerini temizleyebilir. Formononetin ve kalikozin, ksantin / ksantin oksidazın neden olduğu hücre hasarını önemli ölçüde inhibe ettiğini bulunmuşlardır. Bunlar arasında, kalikosinin hem hücresiz sistemde hem de hücre sisteminde en güçlü antioksidan aktiviteyi sergilediğini bildirmişlerdir. Kim ve Yang 'ın *A. membranaceus* türü ile yapmış oldukları çalışmada, *A. membranaceus*'un 7,2-dihidroksi-3', 4'-dimetoksiizoflavan-7-O-y-D-glukozit ve kalikozin-7-O-y-D-glukozit bileşiği, anti-lipit peroksidatif aktiviteleri gösterdiğini bildirmişlerdir (Kim vd., 2004). Li ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, saponin, astragalosid IV, oksidatif stres ve ilgili p38 MAPK aktivasyonunun oluşumunu inhibe ederek hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonunu inhibe edebileceğini bildirmişlerdir (Li vd., 2013).

Suboh ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda *Artemis herba-alba* Asso, *Ferula hermonis* Boiss., *Hibiscus sabdariffa* L. *Teucrium polium* L., *Trigenolla foneum-graecum* L. ve *Allium sativum* L. bitkilerinin koruyucu etkilerine bakılmıştır. Yapılan bu araştırma sonucunda H₂O₂ verilmesi sonucunda artan MDA değerlerinin *A. sativum* ve *N. sativa* bitki ekstraktlarının yüksek konsantrasyonları ile düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Suboh vd., 2004). Maurya ve Rizvi tarafından yapılan çalışmada genç orta ve yaşlı bireylerden elde ettikleri eritrositlere t-BHP uygulamışlardır. Oluşturulan oksidatif hasara karşı dünyada en yaygın olarak kullanılan *Camellia sinensis* L. Kuntze (çay) bitkisinin ekstraktları kullanılmış ve bu çay bitkisinin ekstraktlarının koruyucu etkisini saptayabilmek için MDA ve GSH değerleri ölçülmüştür. MDA değerlerindeki azalışın, GSH değerlerinde ise artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda çayın iyi bir antioksidan olarak koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Maurya ve Rizvi, 2009). Yapılan literatür taramaları sonucunda çalışmış olduğumuz *Astragalus* türleri ile ilgili eritrosit hemolizi inhibisyonu ve serumda TAS, TOS ve OSI analizleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Çalışmamızda oksidatif hasarın hücrelere vermiş olduğu hasarı ve bu hasarın bitkilerimizle nasıl engellendiğini belirlemek için eritrosit ve serum örneklerinde çalışılmıştır. Her iki çalışmada hasarlayıcısı olarak t-BHP kullanılmıştır. t-BHP oksidatif hücre hasarını oluşturmak için kullanılan organik bir hidroksiperoksittir. Eritrosit hemolizi inhibisyonu çalışmamızda, artan bitki konsantrasyonlarının eritrosit hemolizini inhibisyonu düşürdüğü tespit edilmiştir. *Astragalus plumosus* bitkisinin Şekil 3.2'de verilen 12.5 mg/mL'lik konsantrasyonun, antioksidan aktivitesi iyi bilinen C vitamene göre hemolizi

daha fazla inhibe ettiđi tespit edilmiřtir. *Astragalus microcephalus* bitkisinin řekil 3.3’de verilen 12.5 mg/mL’lik konsantrasyonu ise C vitamini ile aynı oranlarda hemolizi dūřurdūđu tespit edilmiřtir.

Terzi ve arkadaşlarının *Urtica dioica* ile yapmış oldukları çalışmada karaciğer iskemi reperfūzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda bitkinin karaciğer üzerine koruyucu etkisine bakmışlardır. Çalışma sonunda karaciğer iskemi hasarındaki TOS, TAS ve OSİ değerlerini sırasıyla, 49.9 ± 7.32 , 2.47 ± 0.28 ve 20.3 ± 3.37 şeklinde bulmuşlardır. *Urtica dioica* ile tedavi sonrasındaki TOS, TAS ve OSİ değerlerini sırasıyla, 47.2 ± 4.94 , 3.03 ± 0.44 ve 15.83 ± 2.22 şeklinde bulmuşlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda *Urtica dioica* bitkisinin karaciğerdeki iskemi reperfūzyon hasarında antioksidan kapasiteyi arttırdığı oksidatif stresi ve karaciğerdeki enzim seviyelerini ise azalttığını bildirmişlerdir (Terzi vd., 2009).

Yapmış olduğumuz çalışmada serumda t-BHP ile oluşturulan hasarın giderilmesi Tablo 3.5’de verilen *A. plumosus* ekstraktı ile muamalesi sonucunda TOS, TAS ve OSİ değerleri sırasıyla 25.8 ± 0.798 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L, 1.41 ± 0.120 mmol Trolox Eq/L ve 1.83 ± 0.265 şeklinde, *A. microcephalus* ekstraktı ile muamalesi sonucunda TOS, TAS ve OSİ değerleri ise sırasıyla, 24.7 ± 5.23 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L, 1.44 ± 0.114 mmol TroloxEq/L ve 1.71 ± 0.233 şeklinde tespit edilmiştir. Hasara uğratılan serum örneklerinin ekstraktlarla muamesi sonucunda serumda oluşturulan hasarın giderildiği sonucuna ulaşıldığı sōylenabilir.

C vitaminin OSİ değeri ise 1,19 olarak tespit edildi. Serumda kullanılan ekstrakt dozu antioksidan analizlerinde kullanılan ekstrakt dozuna gōre ayarlanmıştır. Buradan yola çıkarak serumda oluşturulan hasarın giderilmesinde bitki ekstraktlarının gōstermiř olduğu antioksidan aktiviteden kaynaklandığı sōylenebilir. Eritrositlerde ve serum çalışmalarının her ikisinde de antioksidan aktivitesi bilinen C vitamini kullanılmıştır. Her iki çalışmada da oksidatif hasarın giderilmesinde C vitaminine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *A. plumosus* ve *A. microcephalus* bitkilerinin iyi bir antioksidan koruyucu olduğu sōylenebilir.

Literatūr taramalarının sonucunda Astragalus tūrleri ile ilgili yapılan oksitadif hasar çalıřmaları ile ilgili oksidatif hasarın giderilmesinde *Astragalus* tūrlerinin içeriđinde bulunan zengin flavanoid ve saponinlerden kaynaklandıđı dūřūncesini ortaya koymaktadır.

Bu alışma, *A. microcephalus* ve *A. plumosus* yaprak ekstraktlarının antioksidan etkilerinin; α -glukozidaz enzim inhibisyonu ve hemoliz inhibisyonun sağlandığı, serumda oksidatif hasarın giderildiğini belirleyen ilk çalışma olup, ekstraktların bu etkinliklerinin

içeriklerinde bulunan tüm bileşenlerin katkı verebilmiş olabileceği sonucuna varılmıştır.Biyoteknoloji alanında yapılan bu çalışmalardan elde edilen müspet verilerle bitkilerimizin alternatif, tamamlayıcı bir ürün olarak gıda ve ilaç endüstrisine adaptasyonunun sağlanabileceği, oksidatif hasarın sebep olduğu çeşitli hastalıklara karşı kullanılabileceği öngörülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yaptığımız bu çalışmada *A. microcephalus* ve *A. plumosus* bitkilerinin yaprak ekstraktları su, etanol ve PBS'li ekstraktlarının 25 mg/mL konsantrasyonlarında en yüksek polifenol içeriğe *A. microcephalus*'un etanollü ekstraktında, en yüksek demir indirgeyici güç aktivitesine *A. microcephalus*'un PBS'li ekstraktında, en yüksek flavanoid içeriğe *A. microcephalus*'un sulu ekstraktında rastlandı.
2. Ekstraktlarda en yüksek DPPH aktivitesine *A. microcephalus*'un PBS'li ekstraktında rastlandı.
3. *A. microcephalus* ve *A. plumosus* bitkilerinin etanollü yaprak ekstraktlarında α -glukozidaz enzimini inhibe ettiği ve antidiyabetik etki gösterdiği sonucuna varıldı. En yüksek α -glukozidaz aktiviteye *A. plumosus* ekstraktında rastlandı.
4. Yapılan hemoliz inhibisyonu çalışmasında bitkilerin PBS'li yaprak ekstraktlarının üç farklı konsantrasyonu kullanıldı ve artan bitki konsantrasyonuna göre hemoliz inhisiyonunda doğru orantılı bir şekilde arttığı sonucuna varıldı. Hemolizi inhibe etme kapasitesi *A. plumosus* ekstraktının *A. microcephalus*'a göre daha fazla olduğu sonucuna varıldı.
5. Serumda oluşturulan oksidatif hasar bitkilerin PBS'li ekstraktları ile inhibe edildiği sonucuna varıldı.
6. Bu bitkilerin içeriğindeki saponinler izole edilip kimliklendirilebilir.
7. Çalışmada yer alan bitkilerle ilgili farklı ekstraksiyon yöntemleri yapılarak antioksidan etkinliklerinin karşılaştırması önerilir.
8. Bitkilerin α -amilaz enzimi inhibisyonu ile ilgili çalışmaların yapılabileceği önerilir.
9. Bu bitkilerin farklı kısımları ilgili antioksidan çalışmalarının yapılabileceği önerilir.
10. Çalışma hücre kültürü ve deneysel modellerle desteklenebilir.
11. Docking çalışmalarıyla α -glukozidaz etken madde etkileşimi bakılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abraham, R.T., 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes & Development, 2, 225-231.
- Agyemang, K., Han, L., Liu, E., Zhang, Y., Wang, T. ve Gao, X., 2013. Recent Advances in *Astragalus membranaceus* Anti-diabetic research: pharmacological effects of its phytochemical constituents. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 654643, 9 pages.
- Ajila, C.M. ve Prasada Rao, U.J.S., 2008. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. Food and Chemical Toxicology, 46, 303-309.
- Akan, H., Firat M. ve Ekici M., 2007. *Astragalus bahcesarayensis* (Leguminosae-Papilionodeae), a newspecies of section *Alopecuroideio* C. from Turkey. Botanical Journal of the Linnean Society, 156, 439-444.
- Akyol, M. A., 2007. Tavşan modelinde laparoskopik iskemik prekondisyon manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Afyonkarahisar, 87s.
- Akyurt, B., 2014. Ülkemizde tüketilen bazı yaprakların antioksidan ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Kayseri, 53s.
- Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C. ve Flores-Saenz, J.L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. Journal of Ethnopharmacology, 61, 101-110.
- Altan, N., Dinçel, S.P. ve Koca., C., 2006. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi, 31, 2, 51-56.
- Anderson, W.M.D. ve Bridgeman, E.M.M., 1985. The composition of the proteinaceous polysaccharides exuded by *Astragalus microcephalus*, *A. gummifer* and *A. Kurdicus*, the sources of turkish gum trachanth. Chemistry Department, The university, Edinburg EH 9 3JJ, U.K., 24, 10, 2301 – 2304.
- Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A.M. ve Weffort-Santos, A.M., 2008. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. Nutrition Research, 28, 457-463
- Arkan, T., 2011. *Daphne oleoides* subsp. *Oleoides* ve *Daphne sericea*'nın farklı çözücülerle antioksidan özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Konya, 63s.

- Arumugam, R., Kirkan, B. ve Sarikurkcu, C., 2018. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of *Astragalus ponticus* Pall. South African Journal of Botany, SAJB-02072, No. of Pages 6.
- Arslan, A., 2010. *Astragalus türmenesensis* O. Tugay & Ertugrul (*Fabaceae*) üzerine morfolojik ve anatomik bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 38s.
- Arslan, M. ve Şenyiğit, U., 2016. Effects of irrigation programs formed by different approaches on the yield and water consumption of black cumin (*Nigella sativa* L.) under transition zone in the west anatolia conditions. Tarım Bilimleri Dergisi, 24, 22-32.
- Atabek, E., 1973. Kapadokyalı Aretaeus monografi, Diyabet Günleri, Kayseri, 16 s.
- Atalay, M. ve Laaksonen, D. E., 2002. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. Journal of Sports Science and medicine, 1, 1-14.
- Aycicek, A., Erel, O. ve Kocyigit, A., 2005. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. Pediatr international, 6, 47,635-639.
- Aytaç, Z. ve Erkul, K.S., 2013, *Astragalus yukselii* (Leguminosae), a new species from Turkey. Turkish Journal of Botany, 37, 836-840.
- Babior, B.M., 2000. Phagocytes and oxidative stress. The American Journal of Medicine, 109, 1, 33-34.
- Bain, B.J., 2017. Structure and function of red and white blood cells, Medicine.
- Balkan, S., 2017. Eritrositlerde *in vitro* oksidatif strese karşı antioksidan olarak değerlendirilen çeşitli bitki ekstraktları. Trakya University Journal of Natural Sciences, 18, 2, 185-191.
- Barneby, 1964. "A Short Histoy of the Genus", pl-8.
- Bedir, E., Çalış, İ. ve Ikhlas, K. A., 2000. Macrophyllosaponin E: A Novel Compound from the Roots of *Astragalus oleifolius*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 48 ,7, 1081-1083.
- Bhattacharya, S., Rasmussen, M.K., Christensen, L.P., Young, J.F., Kristiansen, K. ve Oksbjerg, N., 2014. Naringenin and falcarinol stimulate glucose uptake and TBC1D1 phosphorylation in porcine myotube cultures. Journal of Biochemical and Pharmacological Research, 2, 91-98.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56, 11, 317-33.

- Büyüköztürk, K., 1992. Diabetes Mellitus (Şekerli Diyabet), B. S. Hastalıkları. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, İstanbul. s. 190-207.
- Boğa, R., 2013. Muş ilindeki saplı meşe (*Quercus Robur Subsp. Pedunculiflora*) yaprak ve palamudu ile bu ağaçtan elde edilen gezo pekmezinin antioksidan aktivitelerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Muş, 47s.
- Cadenas, E. ve Packer, L., 2002. Handbook of Antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-05475.
- Cao, G. ve Prior, R.L., 1999. The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Methods in Enzymology, 299, 50-62.
- Carl, H., Soumya, R., Srinivas, P. ve Vani, R., 2016. Oxidative stress in erythrocytes of banked ABO blood. Hematology, 21,10, 630-634.
- Carraro, P., Servidio, P. ve Plebani, M., 2000. Haemolyzed specimens: a reason for rejection or clinical challenge? Clinical Chemistry, 46, 306-7.
- Carvalho, A.A., Santos, R.L., Farias, S.R.R., Chaves, H.M., Feritosa, M.C., Junior, V.M.G., Araujo, S.R.M., Ferreira, P.M.P. ve Pessoa, C., 2018. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. Quimica Nova, 41, 4, 405-411.
- Clarkson, P.M., 1995. Antioxidants and physical performance. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, 131-41.
- Coombes, J.S., Powers, S.K., Rowell, B., Hamilton, K.L., Dodd, S.L., Shanely, R.A. ve Sen, C.K., 2001. Packer L. Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. Journal of Applied Physiology, 90, 1424-30.
- Coşkun, A., Aral, H., Güvenen, G. ve Gültepe., M., 2005. Farklı düzeylerdeki hemolizin sodyum ölçüm yöntemlerine etkisi. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 3, 1, 1-7.
- Çakatay, U. ve Kayalı, R., 2006. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 37, 162-167.
- Çakıroğlu, T.N., 2010. Çeşitli Çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 65s.
- Çöçen, E., Özcan, E.T., Atay, S., Pala, M. ve Murathan, İ., 2014. Gümüşhane İli Merkez İlçe Köyleri Florasında Yoğun Olarak Bulunan Ballı Bitki Türleri ve Meraların Çiçeklenme Periyotları. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4, 2, 126-133.
- Davis, P.H., 1970. "Flora of Turkey and The East Aegean Islands", Edinburgh Univ. Press. Edinburgh, 3, 49-254.

- Demir, E. ve Yılmaz, Ö., 2014. Streptozotosin ile Tip-1 diyabet oluşturulan sıçanlarda acı badem yağının serum ve eritrositlerdeki bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. Marmara Pharmaceutical Journal, 18, 13-21.
- Demir, S., 2010. Propolis Ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 83s.
- Denizli, N., Horo, İ., Gülcemal, D., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Koz, Ö., Piacente, S. ve Çalışkan, A.Ç., 2014. Cycloartane glycosides from *Astragalus plumosus* var. *Krugianus* and evaluation of their antioxidant potential. Fitoterapia, 92, 211-218, Turkey.
- Dengah, H. ve Salehi, P., 2015. Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. Journal of Food and Drug Analysis, 1-10.
- Dinçer, Y. ve Akçay, T., 2000. DNA Hasarı. Türk Biyokimya Dergisi, 25, 2, 73-79.
- Doğmuş, D. ve Durucasu, İ., 2013. Keten tohumu çeşitlerinin N-bütanol fraksiyonlarının fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesi. Celal Bayar Üniversitesi. Fen Bilimleri Dergisi, 9, 1, 47 – 56.
- Dülger, H., Alıcı, S., M., Şekeroğlu, R., Noyan, T. ve Yalçınkaya, A., 2002. Kanserli hastalarda kemoterapinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Van Tıp Dergisi, 9, 2.
- Ebegboni, J.V., Dickenson, M.J. ve Sivasubramaniam, D.S., 2019. Antioxidative effects of flavonoids and their metabolites against hypoxia/ reoxygenation-induced oxidative stress in a human first trimester trophoblast cell line. Food Chemistry, 272, 117–125.
- Ekici, M., Aytaç, Z., Akan M. ve Pınar, M., 2008 “A new species *Astragalus* L. (section: Onobrychoidei DC.: Fabaceae) from Turkey”. Botanical. Journal of the Linnean. Society, 157.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N., 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Ankara (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Red Data Book Of Turkish Plants (*Pteridophyta* And *Spermatophyta*), Ankara, 246s.
- Emecen, Ö., 2009. Astımlı hastalarda serum total oksidan/antioksidan status ve ecp düzeylerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Biyokimya Araştırma Laboratuvarı, İstanbul, 70s.
- Engin, A. ve Altan, N., 2000, Effects of obstructive jaundice on antioxidative capacity of human red blood cells. Haematologia, 30, 2, 91-96.
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clinical Biochemistry, 38, 12, 1103-11.

- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry, 37, 4, 277-85.
- Erik, S., ve Tarıkahya, B., 2004. Türkiye Florası Üzerine. Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi, Alp Matbaası, Ankara, 17,139-163.
- Ersoy, A. ve Dilek, K., 1999. Hemodiyaliz hastalarında eritrosit membran lipid peroksidasyon ve antioksidatif homeostazis değişiklikleri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 1, 1-4, BURSA.
- Evans, W. J., 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. The American Journal of Clinical Nutrition., 72, 647-52.
- Ettxeberria, U., de la Garza, A.L., Campion, J., Martinez, J.A. and Milagro, F.I., 2012. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. Expert Opinion on Therapeutic Targets 16, 269-97.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S., 2011. Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11, 1, 52- 67.
- Fu, J., Wang, Z., Huang, L., Zheng, S., Wang, D., Chen, S., Zhang, H. ve Yang, S., 2014. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi). Phytotherapy Research, 28, 1275–1283.
- Freeman, B.A. ve Crapo, J.D., 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Laboraty Investigation, 47, 412-426.
- Giles, G.I ve Jacob, C., 2002. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. Biological Chemistry, 383:375-88.
- Gökpinar, S., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y., 2006. Algal antioksidanlar. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 23, 85-89.
- Graham, P.H ve Vance, C.P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiology, 131: 872 – 877.
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry, 41, 2, 1819-28.
- Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M. ve Apak, R., 2005. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical. Talanta, 65, 1226-1232.
- Gülcemal, D., Alankuş, A., Perrone, A., Özgökçe, F., Piancente, S., ve Bedir, E., 2011. Cycloartane glycosides from *Astragalus aureus*. Phytochemistry, 72, 761–768.

- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T.ve Başer KHC., 2008 “Flora of Turkey and The East Aegean Islands”, 11, 79-88, 2000.741-747.
- Grover, J. K, Yadav, S. ve Vats, V., 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. Journal of Ethnopharmacology, 81, 81-100.
- Halliwell, B., 1987. Oxidants and human disease: Some new concepts. FASEB Journal, 1: 358-364.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M., 1989. Free radicals in biology and medicine. Second ed, Oxford, Oxford University Pres.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M., 1992. Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119, 598-620.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutrition Reviews, 52, 253-265.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J. ve Aruoma, O. I., 1995, The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology, 33, 601-617.
- Halliwell, B., Clement M.V., ve Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Letters, 486,10-13.
- Hasançebi, S., 2003. Studies on tissue culture and transformation of *Astragalus chrysochlorus*. PhD Thesis. Istanbul University, Institute of Science and Technology. İstanbul, Turkey.
- Hazer, Y., ve Hamamcıoğlu, C.A., 2017. Türkiye’de yayılış gösteren kan şekerini etkileyen bitkiler. Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi, 2, 63-72.
- Inzucchi, S.E., 2003. Classification and diagnosis of diabetes mellitus, In: Ellenberg & Rifkin’s Diabetes mellitus, Porte, D.Jr., Sherwin, R.S., Baron, A., McGraw-Hill, New York, 265-277.
- Ionkova, I., Momekov, G. ve Proksch, P., 2010. Effects of cycloartane saponins from hairy roots of *Astragalus membranaceus* Bge., on human tumor cell targets. Fitoterapia, 81, 447-451.
- Isaev, I.M., Mamedova, R.P., Agzamova, M.A. ve Isaev, M.I. 2007. Triterpene glycosides and their genins from *Astragalus*. LXXIII. Stereochemistry of C-23 and C-24 in cycloartan and lanostan-16 β , 23, 24, 25-tetraols. Chemistry of Natural Compounds, 43, 115–116.
- Jensen, S.J.K, 2003. Oxidative stress and free radicals. Journal of Molecular Structure (Theochem), 666–667, 387–392.

- Jomova, K., 2011. Valko MAdvances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology, 283, 65-87.
- Kadioğlu, B., Kadioğlu, Y. ve Turan, Y., 2008. Gevenlerin farklı kullanım alanları ve önemi. Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi, 14, 1307-3311.
- Kathi, J. Kemper, M.D MPH ve Rebecca Small, M.D.1999. The Longwood Herbal Task Force (<http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>) and The Center for Holistic Pediatric Education and Research.
- Kaymak, G., Akbulut, C., Esmer, H.E., Kayhan, F.E. ve Yön, N.D., 2014. Sucul organizmalarda çevresel şartlara karşı geliştirilen oksidatif stres mekanizmaları ve adaptif yanıtlar. Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 4, 137-151.
- Keskin, H., Erkmen, G., 1987. Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci Basım, İstanbul.
- Keskin, C., Özen, Ç.H., Toker, Z., Kızıl, G. ve Kızıl, M., 2018, *Astragalus diphtherites* FENZL var. *diphtherites* ve *Astragalus gymnalopecias* RECH. FIL'in gövde ve kök kısımlarından farklı çözücüler ile elde edilen özütlerin *in vitro* antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 21, 2, 157-166.
- Khalili, M., Ebrahimzadeh, M.A. ve Safdari, Y., 2014. Antihaemolytic activity of thirty herbal extracts in Mouse red blood cell. Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju, 65:399-406.
- Kim, E.J. ve Yang, K.S., 2005. Antilipidperoxidative activity of *Astragalus membranaceus*. Yakhak Hoechi, 49, 11–19.
- Klein, O., Lynge, J., Endahl, L., Damholt, B., Nosek, L., ve Heise, T., 2007. "Albumin-bound basal insulin analogues (insulin detemir and NN344): comparable time-action profiles but less variability than insulin glargine in type 2 diabetes. Diabetes, Obesity and Metabolism, 9, 3, 290–299.
- Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A. ve Çuhadar, S., 2011. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. Biochemia Medica, 21, 79–85.
- Kopani, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P. ve Csaba, B., 2005. Oxidative stress and electron spin resonance. Clinica Chimica Acta, 364, 61– 66.
- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., ve Shetty, K., 2007. "Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. Journal of Food Biochemistry, 31, 3, 370–385.
- Lewis, G., B. Schrire, B., MacKinder ve M. Lock (eds). 2005. Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- Li, W.Z, Li, W.P. ve Yin, Y.Y., 2007. Effects of AST and ASI on metabolism of free radical in senescent rats treated by HC. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 32, 2539-2542.

- Li, X., Wang, X., Han, C., Wang, X., Xing, G., Zhou, L., Li, G. ve Niu, Y. 2013. Astragaloside IV suppresses collagen production of activated hepatic stellate cells via oxidative stress-mediated p38 MAPK pathway. Free Radical Biology & Medicine, 60, 168–176.
- Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., Zhang, Y., ve Wang, T., 2014. A Review of Recent Research Progress on the Astragalus Genus. Molecules, 19, 18850-18880.
- Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M. ve Pereira-Wilson, C., 2006, Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. Life Sciences, 79, 2056-2068.
- Lin, Y.J. ve Jin Tang, C.Y, 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on Mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry, 101,140–147.
- Lins, G.P., Pugine Piccoli, M.S. ve Scatolini, M.A., 2018. In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. Heliyon, 4, 9.
- Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A. ve Plebani, M., 2008. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 46, 6.
- Lippi, G., Plebani, M., Di, Somma, S. ve Cervellin, G., 2011. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 48, 3, 143-153.
- Liu, P., Zhao, H. ve Luo, Y., 2017. Anti-Aging Implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic. Aging and disease, 8, 6, 868-886.
- Liu, M, Wu, K, Mao, X, Wu, Y ve Ouyang, J., 2009. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: Regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle. Journal of Ethnopharmacology, 127, 32–37.
- Mai, T. T, Thu, N. N, Tien, P.G. ve Chuyen, N. V, 2007. Alpha-Glucosidase Inhibitory and Antioxidant Activities of Vietnamese Edible Plants and Their Relationships with Polyphenol Contents. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 53, 267-276.
- Mamedova, R. P. ve Isaev, M. I, 2004. Triterpenoids from *Astragalus* Plants, Chemistry of Natural Compounds, 40, 4.
- Marles, R.J. ve Farnsworth, N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine, 2, 2, 137-189.

- Maurya, P.K. ve Rizvi, S.I., 2009. Protective role of tea catechins on erythrocytes subjected to oxidative stress during human aging. Natural Product Research, 23, 12, 1072-1079.
- Maassoumi, A.A., 1998. “*Astragalus* in the Old World, Check-List”, Research Institute of Forest and Rangelands, İran.
- McCulloch, M., See, C., Shu, X., Broffman, M., Kramer, A., Fan, W., Gao, J., Lieb, W., Shieh, K., ve Colford, M.J., 2006. *Astragalus*- Based Chinese Herbs and Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non Small-Cell Lung Cancer: Meta-Analysis of Randomized Trials. Journal of Clinical Oncolog, 24, 3.
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 3.
- Moezi, L., Arshadi, S.S., Motazeidan, T., Seradj S.H.ve Dehghani, F., 2018. Anti-Diabetic Effects of *Amygdalus Lycioides* Spach in Streptozocin- Induced Diabetic Rats. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 17, 1, 353-364.
- Mohagheghzadeh, A., Faridi, P., Arkadani, S.M. ve Ghasemi, Y., 2006. Medicinal Smokes. Journal of Ethnopharmacology, 108, 161-184.
- Motomura, K., Fujiwara, Y., Kiyota, N., Tsurushima, K. Takeya, M. Nohara, T. ve Nagai, R., 2009. Ikeda, T. Astragalosides isolated from the root of astragalus radix inhibit the formation of advanced glycation end products. Journal of Agricultural. Food Chemistry, 57, 7666–7672.
- Mouffouka, S., Marcurth, L., Benkhalel, M., Boundiaf, K., Wolfender, L.J., ve Haba, H., 2017. Two New Prenylated Isoflavonoids from *Erinacea anthyllis* with Antioxidant and Antibacterial Activities. Natural Product Communications, 12, 7, 1065-1068.
- Murray, A.P., Faraoni, M.B., Castro, M.J., Alza, N.P. ve Cavallaro, V., 2013. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer’s Disease Therapy. Current Neuropharmacology, 11, 388-413.
- Naczki, M. ve Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of the Chromatography, 1054, 95-111.
- Okoko, T. ve Ere, D., 2012. Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. Asian Pac J Trop Biomed, 2,6, 449-453.
- Olchowik, E., Sciepek, A., Mavlyanov, S. ve Abdullajanova, N., 2012. Antioxidant capacities of polyphenols from Sumac (*Rhus typhina* L.) leaves in protection of erythrocytes against oxidative damage. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2, 99-105.
- Ozhogina, O.A. ve Kasaikina, O.T., 1995. Beta-carotene as an interceptor of free radicals. Free Radical Biology Medicine, 19, 575-81.

- Öğetürk, M., Çolakoğlu, N., Kuş, M.A., Kuş, İ. ve Sarsılmaz, M., 2009. Karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel akciğer hasarında kafeik asit fenetil esterinin koruyucu etkinliği. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 23, 2, 57- 61.
- Özcan O, Erdal, H. Çakırca, G. ve Yönden, Z, 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, Journal of Clinical and Experimental Investigations, 6, 3 331-336.
- Öztürk, İ. Ç, Öztürk, F., Gül, M, Ateş, B. ve Çetin, A., 2009. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. Cell Biochemistry And Function, 27, 309-315.
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q ve Singal, P.K, 1998. Antioxidant potentials of Vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. Free Radical Biology and Medicine, 26, 746–761.
- Palmer, F.M., Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty S.R, McAnulty L, Swick N.S., Utter A.C., Vinci D.M. ve Morrow J.D., 2003. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. European Journal of Applied Physiology, 89, 100-7.
- Paneda, C., Villar, A.V., Alonso, A., Goni, F.M, Varela, F. ve Brodbeck, U., 2001. Purification and characterization of insulin-mimetic inositol phosphoglycan-like molecules from grass pea (*Lathyrus sativus*) seeds. Molecular Medicine, 7, 454-460.
- Pereira, L.D., Cunha, A.P.S., Cardoso, P.R.C., Rocha, Q.C., Vilegas, W. ve Sınhorin, P.A., 2018. Antioxidant and hepatoprotective effects of ethanolic and ethyl acetate stem bark extracts of *Copaifera multijuga* (Fabaceae) in mice. Acta Amazonica, 48, 4, 347- 357.
- Perez, R.M., Ocegueda, A., Muñoz, L., Avila, J., ve Morrow, W., 1984. A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. Journal of Ethnopharmacology 12, 253–262.
- Pitkanen, O.M., Martin, J.M., Hallman, M., Akerblom, H.K., Sariola, H. ve Andersson, S.M, 1992. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. Life Sciences, 50, 5, 335-339.
- Pushparaj, P., Tan, C.H. ve Tan, B.K.H, 2000. Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacol, 72, 69-76.
- Rios, J.L ve Waterman, P.G, 1997. A Review of the Pharmacology and Toxicology of *Astragalus*. Phytotherapy Research, 11, 411-418.
- Rajesh, K.P., Manjunatha, H., Krishna, V. ve Kumara Swamy, B.E, 2013. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Mesua ferra* Linn. Bark extracts on induced oxidative damage. Industrial Crops and Products, 47, 186-198.

- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O. ve Poitout, V., 2004. B- cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. Diabetes, 53, 119-124.
- Ryu, M., Kim, H.E., Chun, M., Kong, S., Skim, B. ve Yu, B.Y. 2008. Jeong, G. Lee, S.J. *Astragali radix* Elicits Anti-inflammation via Activation of MKP-1, Concomitant with Attenuation of p38 and Erk. Journal of Ethnopharmacology, 115, 184-193.
- Sarı, S., 2008. Farelerde ehrlich asit solid tümör modelinde thymus sipyleus ve taurinin, böbrek MDA, glutatyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 94s.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Leblebici E ve Bekât, L., 2008., Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 267-26s.
- Sharma, S, Dwivedi, J, Jha, A. K. ve Swapnil, P., 2010. Experimental models of Diabetes. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy, 2, 292-301.
- Srour, T., Bilot, Y.Y., Juma, M. ve Irhimeh, M.R., 2000. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increases osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. Clinic Hemorheology and Microcirculation, 23: 13-21.
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M.ve Villena, F., 2007. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. Food and Chemical Toxicology, 45, 130-135.
- Okçu, M., 2012, Gümüşhane İlinin Tarımsal Yapısı, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2, 2, 93-103.
- Tekkeş, Y., 2006. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 66s.
- Terzi, A., Yıldız, F., Çoban, S., Taşkın, A., Bitiren, M. ve Aksoy, N., 2009. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı yapılan sıçanlarda *Urtica dioica*'nın karaciğer üzerine koruyucu etkisi. Düzce Tıp Dergisi, 12, 1, 43-47.
- Tian, H., Lu, J., He, H., Zhang, L., Dong Y, Yao, H, Feng, W. ve Wang, S., 2016. The effect of *Astragalus* as an adjuvant treatment in type 2 diabetes mellitus: A(preliminary) meta-analysis. China Journal of Ethnopharmacology, 191, 206-215.
- Tokaç, D., 2007. Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 112s.
- Turan, İ., 2011. Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksitite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, 84s.

- Uysal İ., 1997. *Astragalus trojanus* endemik türünün morfolojisi anatomisi ve ekolojisi üzerinde gözlemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 13, 1–2, 54–66. 62s.
- Van der Berg, J.J., Op den Kamp, J.A., Lubin, B.H., Roelofsen, B. ve Kuypers, F. A, 1992. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. Free Radical Biology and Medicine, 12, 6, 487-498.
- Velioğlu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. ve Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46, 4113-4117.
- Wang, L. ve Waltenberger, B., 2014. Pferschy-Wenzling, E.M, Blunder, M., Liu, X. and Malainer C, Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. Biochemical Pharmacology, 92, 73-89.
- WHO Expert Committee on Diabetes mellitus, 1980, Second Report. Technical Report Series 646. WHO, Geneva, p: 61.
- Wickens, A. P, 2001. Ageing and the free radical theory. Respiration Physiology, 128, 379–391.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. ve King, H.,2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care, 27, 1047-53.
- Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C. ve Shaw, J., 2011. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Research Clinical Practice, 94, 311-21.
- World Health Organization, 1999. Department of noncommunicable disease surveillance, definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and it's complications, World Health Organization, Geneva.
- Wu, I., Zhou, W., Wei, Q., Chen, P. ve Li, Y., 2018 Cytoprotective effects of the medicinal herb *Astragalus membranaceus* on lipopolysaccharide-exposed cells. Molecular Medicine Reports, 18, 4321-4327.
- Xia, X., Yan, J., Shen, Y., Tang, K., Yin, J. ve Zhang, Y., 2011. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. PLoS One, 6, 2, e16556.
- Xu., F., Cui, W.Q., Wei., Y., Cui, J., Qui, J., Hu, L.L, Gong, Y.W., Dong, C.J. ve Liu, B.J., 2018. Astragaloside IV inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 37, 207.
- Yan, Q. Li, Y., Jiang, Z., Sunc, Y., Zhu, L. ve Ding, Z., 2009. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*, Phytomedicine, 16, 586–593, China.

- Yeşilada, E., Bedir, E., Çalış, İ., Takaishi, Y. ve Ohmoto, Y., 2004, Effects of triterpene Saponins from *Astragalus* species on in vitro cytokinerelease, Journal of Ethnopharmacology, 96, 71–77.
- Yin, Y., Heo, S.I., Jung, M.J. ve Wang, M.H., 2009. Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. Korean Journal of Pharmacognosy, 40, 1–5.
- Yoshihara, D., Fujiwara, N. ve Suzuki, K., 2010. Antioxidants: benefits and risks for long-term health. Maturitas, 67, 103-107.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., ve Qian, M., 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal Agricultural and Food Chemistry, 50, 1619-1624.
- Yusufoğlu, H., Aftab, A., Salkını, A., Prawez., A. ve Zaghloul, A. 2014. Anti inflammatory and hepatoprotective study of *Astragalus plumosus* var. *Akardagicus* and *Astragalus lamarcki* (Family: *Fabaceae*) in wistar albino rats. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 3, 8, 1846-1862.
- Yu, J., Zhang, Y., Sun, S., Shen, J., Qiu, J., Yin, X., Yin, H. ve Jiang, S., 2006. Inhibitory effects of astragaloside IV on diabetic peripheral neuropathy in rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 84,579–587.
- Yu, D.H., Bao, Y.M., Wei, C. ve An, L.J., 2005. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus* Bunge. Biomedical and Enviromental Sciences, 18, 297–301.
- Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M. ve Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature ,414, 782– 787.
- Zhou, X., Xu, Y., Yang, G. ve Li, F., 2011. Increased galectin-1 expression in muscle of *Astragalus* polysaccharide-treated Type 1 diabetic mice. Journal of Natural Medicine. 65, 500–507.

7. EKLER



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

Sayı : 24237859-584
Konu: Etik Kurul onay belgesi

23/10/2017

Sayın: Y.Doç. Dr. İbrahim TURAN
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

“Gümüşhane’de Bulunan *Astragalus microcephalus* ve *Astragalus plumosus* Bitkilerinin Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu ve Antidiyabetik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı etik kurul 2017/140 protokol numaralı tez çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

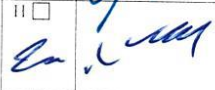
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Gümüşhane’de Bulunan <i>Astragalus microcephalus</i> ve <i>Astragalus plumosus</i> Bitkilerinin Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu ve Antidiyabetik Etkilerinin İncelenmesi”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2017 / 140		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Y.Doç. Dr. İbrahim TURAN		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik ve Biyomühendislik		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Y.Doç.Dr.Selim DEMİR, Yük.Lis.Öğr.Ayşe ARSLAN		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☐			

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 5	Tarih: 16/10/2017
	Y.Doç.Dr.İbrahim TURAN'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Yük.Lis.Öğr.Ayşe ARSLAN'a ait "Gümüşhane'de Bulunan <i>Astragalus microcephalus</i> ve <i>Astragalus plumosus</i> Bitkilerinin Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu ve Antidiyabetik Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı 2017/140 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Tıbbi Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİMLİ
Prof.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer.	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİMLİ
Y.Doç.Dr.Demet SAĞLAM AYKUT Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

1991 tarihinde Gümüşhane’de doğdu. İlköğretimini Işıl Sema Doğan İlköğretim Okulu’nda tamamladı. 2005 yılında Ali Fuat Kadirbeyoğlu Anadolu Lisesi’nde eğitim gördükten sonra 2010 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite eğitime başladı. 2012 yılında Gümüşhane Devlet Hastanesi Laboratuvarında staj yaptı. 2014 yılında On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2014 yılında Gümüşhane Türk Telekom Fen Lisesinde Biyoloji Öğretmeni olarak çalıştı. 2015 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans programına başladı. 2016-2017 yıllarında Gümüşhane Final Özel Eğitim Kurumlarında Biyoloji Öğretmeni olarak çalıştı. 2017-2018 Gümüşhane Lisesi ve Mareşal Çakmak Sosyal Bilimler Lisesi’nde biyoloji öğretmenliği yaptı. 2018 yılında Şehit Tamer Özdemir Anadolu Lisesi’nde Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaya başladı. Orta düzeyde İngilizce bilmektedir.