

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gypsophila sphaerocephala TÜRÜNÜN FENOLİK ve ESANSİYEL
YAĞ İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ, ANTİOKSİDAN ve
SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Şebnem DEĞİRMENCİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2019
Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Dr. Öğretim Üyesi Ahmet ALTAY danışmanlığında, Şebnem DEĞİRMENCİ tarafından hazırlanan bu çalışma 24.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza:



Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza:



Üye : Dr. Öğretim Üyesi Ahmet ALTAY

İmza:



Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 12 / 07 / 2019 tarih ve 27/6..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mustafa Fatih ERTUGAY
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“*Gypsophila sphaerocephala* türünün fenolik ve esansiyel yağ içeriğinin belirlenmesi, antioksidan ve sitotoksik aktivitesinin incelenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezini tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 24/06/2019


Şebnem
DEĞİRMENCİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Gypsophila sphaerocephala* TÜRÜNÜN FENOLİK ve ESANSİYEL YAĞ İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ, ANTİOKSİDAN ve SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

Şebnem DEĞİRMENCİ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY

Bu çalışmada, *Gypsophila sphaerocephala* türünün fenolik ve esansiyel yağ içeriğinin belirlenmesi, antioksidan ve antiproliferatif aktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bitkiden elde edilen su ve metanol ekstraktları'nın toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları sırasıyla Folin Ciocalteu ve Alüminyum klorür kolorimetrik metoduyla, fenolik ve esansiyel yağ içerikleri ise sırasıyla RP-HPLC ve GC-MS analizleriyle belirlendi. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikalini giderme, ABTS katyon radikalini giderme, Fe²⁺ metal iyonlarını şelatlama ve bakır (II) iyonlarını indirgeme kapasiteleri üzerinden değerlendirildi. Ekstrelerin, meme (MCF-7), kolon (HT-29) ve karaciğer (HepG2) kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT testleriyle incelendi. Bitkinin metanol ekstresinin fenolik ve flavonoid içerik bakımından su ekstresine kıyasla daha zengin olduğu gözlemlendi. HPLC analizleri sonucunda, bitkinin yapısında bol miktarda 3,4-dihidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilin, sirinjik asit, vanilin ve rosmarinik asit tespit edilmiştir. Fenolik içeriklerine paralel olarak, bitkinin metanol ekstresi'nin DPPH radikal süpürme, metal şelatlama ve bakır indirgeme kapasitelerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Su ekstresinin ise ABTS katyon radikalini daha fazla süpürdüğü gözlemlendi. GC-MS analizleri bitkinin esansiyel yağ içeriği bakımından oldukça zengin olduğu ortaya konuldu. Sitotoksikite testleri sonucunda, metanol ekstresinin su ekstresine kıyasla kanser hücre hatlarına karşı daha yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu ve en yüksek aktiviteyi HepG2 hücrelerine karşı sergilediği görüldü. Elde edilen veriler ışığında, bu çalışmada kullanılan *Gypsophila sphaerocephala* türünün fitoterapide değerlendirilebilecek potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

2019, 68 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Fenolik içerik, GC-MS, HPLC, *Gypsophila sphaerocephala*, Sitotoksikite

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION of PHENOLIC and ESSENTIAL OIL CONTENT of *Gypsophila sphaerocephala* SPECIES, INVESTIGATION of ANTIOXIDANT and CYTOTOXIC ACTIVITY

Şebnem DEĞİRMENÇİ

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ahmet ALTAY

The aim of this study was to determine the phenolic and essential oil content of *Gypsophila sphaerocephala* species and its antioxidant and antiproliferative activity. Total phenolic and flavonoid content of water and methanol extracts obtained from the plant were determined by Folin Ciocalteu and Aluminum chloride colorimetric method, respectively, individual phenolic and essential oil contents were determined by RP-HPLC and GC-MS analysis, respectively. Antioxidant activities of the extracts were evaluated on the basis of their ability to scavenge DPPH free radicals and ABTS cation radicals, chelate Fe^{2+} metal ions and reduce copper (II) ions. Antiproliferative activities of the extracts against breast (MCF-7), colon (HT-29) and liver (HepG2) cancer cell lines were examined by XTT tests. Methanol extract of the plant was observed to be richer in terms of phenolic and flavonoid content than water extract. HPLC analysis revealed that 3,4-dihydroxybenzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillin, sirinjinic acid, vanillin and rosmarinic acid compounds were abundant in the plant. In parallel with the phenolic contents, it was observed that the methanol extract of the plant had higher DPPH radical scavenging, metal chelating and copper (II) reduction capacities. GC-MS analysis revealed that the plant is rich in essential oil content. As a result of cytotoxicity tests, methanol extract showed higher antiproliferative activity against all tested cancer cell lines than water extract, and especially showed the highest activity against HepG2 cells. In the light of the data obtained, it might be concluded that *Gypsophila sphaerocephala* species used in this study has the potential to be evaluated in phytotherapy.

2019, 68 Pages

Keywords: Antioxidant activity, Cytotoxicity, GC-MS, *Gypsophila sphaerocephala*, HPLC, Phenolic content

TEŞEKKÜR

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

Ayrıca ders döneminde bana vermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, Doç. Dr. Mustafa ÇATIR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Hasan KILIÇGÜN'e, Laboratuar çalışmalarım sırasında vermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı kıymetli arkadaşım Ertuğrul CEYRAN'a,

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

Bu süreçte yanımda olan eşime ve laboratuar çalışmalarım sırasında karnımda kalp atışları ve tekmeleri ile benim motivasyon kaynağım olan canım oğlum Toprak Demir'e

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Şebnem DEĞİRMENCİ

Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Serbest Radikaller.....	3
2.2. Antioksidanlar	5
2.2.1. Enzimatik antioksidanlar	6
2.2.1.1. Süperoksit dismutaz.....	6
2.2.1.2. Katalaz.....	7
2.2.1.3. Glutasyon peroksidaz.....	7
2.2.2. Non-enzimatik antioksidanlar.....	7
2.2.2.1. Vitamin A.....	7
2.2.2.2. Vitamin C.....	8
2.2.2.3. Vitamin E.....	9
2.2.2.4. Karotenler	11
2.2.2.5. Fenolik bileşikler.....	11
2.2.2.6. Flavonoidler.....	13
2.3. Esansiyel Yağlar.....	14
2.3.1. Terpen türevleri	15
2.4. Kanser.....	16
2.5. Bitki Familyası	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler.....	20
3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler	20

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	21
3.1.3.1. Toplam fenolik miktar tayini.....	21
3.1.3.2. Toplam flavonoid miktar tayini.....	21
3.1.3.3. DPPH radikal giderme aktivitesi.....	21
3.1.3.4. ABTS radikal giderme aktivitesi.....	21
3.1.3.5. Metal şelatlama kapasite tayini.....	22
3.1.3.6. Bakır indirgeme (Cu^{2+} - Cu^{+}) kapasitesi tayini.....	22
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Bitkisinin toplanması, kurutulması ve ekstraksiyonu	22
3.2.2. Antioksidan aktivite tayin metotları	23
3.2.2.1. DPPH [•] radikalini giderme aktivitesi tayini.....	23
3.2.2.2. ABTS ^{•+} radikal giderme aktivitesi tayini.....	23
3.2.2.3. Metal şelatlama kapasite tayini.....	24
3.2.2.4. Bakır indirgeme (Cu^{2+} - Cu^{+}) kapasitesi tayini	24
3.2.3. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini	24
3.2.3.1. Toplam fenolik miktarı tayini.....	24
3.2.3.2. Toplam flavonoid miktarı tayini.....	25
3.2.4. Bitkinin fenolik içeriğinin RP-HPLC analizleriyle belirlenmesi.....	25
3.2.5. Bitkinin esansiyel yağ profilinin GC-MS ile belirlenmesi	26
3.2.6. Hücre kültürü çalışmaları	27
3.2.6.1. Hücre kültürü koşulları.....	27
3.2.6.2. Hücrelerin çözdürülmesi.....	27
3.2.6.3. Hücrelerin pasajlanması.....	27
3.2.6.4. Hücrelerin dondurulması.....	28
3.2.6.5. Hücre sayımı.....	28
3.2.7. Antiproliferatif aktivite testleri.....	29
3.2.7.1. Ekstrelerinin hazırlanması.....	29
3.2.7.2. XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Antioksidan Aktivite Araştırma Bulguları	32
4.1.1. DPPH radikal giderme aktivitesi bulguları.....	32
4.1.2. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları	34
4.1.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları	36
4.1.4. Bakır indirgeme (Cu^{2+} - Cu^{+}) kapasitesi tayini bulguları.....	37

4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı Araştırma Bulguları	38
4.2.1. Toplam fenolik miktarı bulguları.....	38
4.2.2. Toplam flavonoid miktarı bulguları.....	39
4.3. <i>G. sphaerocephala</i> Türünün HPLC Analiz Bulguları.....	40
4.4. <i>G. sphaerocephala</i> Türünün GC-MS Analiz Bulguları	45
4.5. <i>G. sphaerocephala</i> Türünün Antiproliferatif Aktivite Araştırma Bulguları	53
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	55
5.1. Fenolik ve Flavonoid İçerik Sonuçları	55
5.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları	56
5.3. Esansiyel Yağ İçeriği Sonuçları	58
5.4. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları	58
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması	6
Şekil 2.2. A vitamini'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.3. Askorbik asitin moleküler yapısı	8
Şekil 2.4. Askorbik asitin indirgenme ve yükseltgenme mekanizmaları	9
Şekil 2.5. E vitamini'nin kimyasal yapısı	10
Şekil 2.6. Tokoferol'ün pro-oksidan aktivitesi	10
Şekil 2.7. Beta karotenin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.8. Flavon ve flavonoidlerin kimyasal yapıları	13
Şekil 2.9. Kateşin ve flavonon'ların yapıları	14
Şekil 2.10. Auron ve kalkonların kimyasal yapıları.....	14
Şekil 2.11. İsoantenildifosfat (IPP) ve izomeri dimetil allildifosfat yapıları	16
Şekil 2.12. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin standardize edilmiş hızları.....	17
Şekil 2.13. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin standardize edilmiş hızları	17
Şekil 2.14. <i>Gypsophila sphaerocephala</i> bitki türü.....	18
Şekil 2.15. <i>Gypsophila sphaerocephala</i> türünün Türkiye'deki yayılış alanları	19
Şekil 3.1. Triaçilgliserollerin esterifikasyonu.....	26
Şekil 3.2. Hemositometre ile canlı hücre sayımı.....	29
Şekil 3.3. XTT tetrazolyum tuzu'nun XTT formazana indirgenmesi	30
Şekil 3.4. Ekstrelerinin XTT analizinin 96 kuyucuklu plaka gösterimi.....	30
Şekil 4.1. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi	32
Şekil 4.2. Troloks ve Tokoferol'ün açık yapıları.....	32
Şekil 4.3. BHA ve BHT'nin açık yapıları.....	33
Şekil 4.4. Ekstrelerinin DPPH radikal giderme aktiviteleri	33
Şekil 4.5. Bir antioksidan tarafından ABTS radikalinin giderilmesi	34
Şekil 4.6. Ekstrelerinin ABTS radikal giderme aktiviteleri	35
Şekil 4.7. Metal iyonunun EDTA tarafından şelatlanması	36
Şekil 4.8. Antioksidan yapılar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi.....	37
Şekil 4.9. Ekstrelerinin kuprik iyonlarını indirgeme kapasiteleri	38
Şekil 4.10. Gallik asit'in kimyasal yapısı	38
Şekil 4.11. Gallik asit standart eğrisi	39

Şekil 4.12. Kuersetin'in açık yapısı	40
Şekil 4.13. Kuersetin standart eğrisi	40
Şekil 4.14. Standart fenolik bileşiklerin HPLC kromatogramı	42
Şekil 4.15. <i>G. sphaerocephala</i> türünün su ekstresinin HPLC kromatogramı	43
Şekil 4.16. <i>G. sphaerocephala</i> türünün metanol ekstresinin HPLC kromatogramı	44
Şekil 4.17. <i>G. sphaerocephala</i> türünün GC-MS kromatogramı	46
Şekil 4.18. Su ekstresinin kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesi	53
Şekil 4.19. Metanol ekstresinin kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesi	54



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Serbest radikal kaynakları.....	3
Tablo 2.2. Reaktif oksijen türleri ve serbest olmayan radikaller	5
Tablo 4.1. Örneklerin DPPH radikal giderme kapasiteleri (SD*)	34
Tablo 4.2. Örneklerin ABTS radikal giderme kapasiteleri (SD*)	36
Tablo 4.3. Örneklerin metal şelatlama kapasiteleri (SD*).....	37
Tablo 4.4. Ekstrelerin toplam fenolik madde içerikleri (SD*).....	39
Tablo 4.5. Ekstrelerin toplam flavonoid madde içerikleri (SD*).....	40
Tablo 4.6. Ekstrelerin HPLC analiz sonuçları (SD*).....	45
Tablo 4.7. <i>G. sphaerocephala</i> türünün esansiyel yağ profili	47
Tablo 4.8. Ekstrelerin kanser hücre hatları üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) radikali
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
İPP	İsopentenildifosfat
NO [•]	Nitrik oksit radikali
O ₂ ^{•-}	Süper oksit radikali
OH [•]	Hidroksi radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
RO [•]	Alkoksi radikali
ROO [•]	Peroksit radikali

Kısaltmalar

BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma

1. GİRİŞ

Bitkiler dünyanın var oluşundan günümüze kadar insanlığın her türlü ihtiyacını karşılayan temel canlılar olmuştur. Geçmişte insanlar temel besinlerini temin etmek ve bazı sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle şifalı bitkilerden faydalanmışlardır. Günümüzde insanların doğala yönelmesi ile birlikte doğaya geri dönüş başlamış olup tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Gezgin, 2006; Koçyiğit, 2005).

Bugün bitkisel metabolik ürünler, dünyanın birçok yerinde ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Kullanılan ilaçların büyük bir oranını bitkisel kaynaklar oluşturmaktadır. Günümüzde gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerin büyük bir çoğunluğu sağlık problemlerini gidermek için modern tıbbın yanısıra şifalı bitkilere başvurmaktadır. Hale hazırda reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25' ni bitkisel kökenli kimyasallar oluşturmaktadır (Richard, 2011).

Bitkilerden elde edilen ikincil (sekonder) metabolitler (flavonoid, alkaloid, terpenoid ve tanin gibi) bazı hastalıklarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. (Korukluoğlu vd., 2006). Bu yüzden, tıbbi ve aromatik bitkiler, birçok bilim insanının ilgisini çekmiştir (Bozkurt ve Göker, 1981; Turan, 2000). Şifalı bitki sayısının Türkiye'de 600 civarında olduğu rapor edilmektedir (Baytop, 1999; Alpınar ve Saclı, 1997).

Kanser vakalarını da içeren birçok hastalığın ve metabolik düzensizliklerin nedenlerinden biri de, vücutta oluşan serbest radikallerdir. Serbest radikaller hücre içerisinde çeşitli tahribatlara neden olurlar. İnsan vücudunda bu serbest radikallere karşı koruyucu sistemler mevcuttur. Fakat yoğun stres altında bu sistemler işlevlerini yerine getiremezler ve böylece vücut kendini bu serbest radikallere karşı koruyamaz. Bu türler hücrelerin DNA'larına saldırarak kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olurlar.

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlara sahip kararsız atomlar, atom grupları veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (Akkuş, 1995). Serbest radikaller, hücrelerde hayati fonksiyonlara sahip protein, karbohidrat, lipid ve nükleik asit gibi makro moleküllerine etki ederek tahribatlara yol açabilmektedirler (Henrikson, 1992). Öte yandan, hücreler serbest radikallerin zararlı etkilerini gideren veya engelleyen antioksidan moleküllere sahiptirler (Halliwell, 1996; Stadtman, 2002).

Gelişen teknolojiyle birlikte, sürekli artan bir çevre kirliliği ve modern yaşam tarzı kanser başta olmak üzere birçok hastalığa davetiye çıkarmaktadır. Gün geçtikçe dünya üzerinde bu hastalığa yakalanan bireylerin sayısında ve yine bu hastalıktan dolayı hayatını kaybedenlerin sayısı da artmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar yüksek maliyetli olmakla birlikte tedavi sırasında veya sonrasında birçok istenmeyen yan etkilerde sahiptirler. Bu arzu edilmeyen yan etkileri gidermek veya minimize etmek için doğada var olan tıbbi ve aromatik bitkilerden kansere karşı etkin tedavi aracı olabilecek ve tedavide yan etki sergilemeyecek moleküllerin izole edilmesi, bunların yapılarının açıklığa kavuşturulması ve kemoterapötik ilaç olarak değerlendirilebilecek bir seviyeye ulaştırılması önemli bir çalışma alanı olarak görülmektedir (Akdulum, 2011).

Bu çalışmada, Erzincan iline endemik *Gypsophila sphaerocephala* türünden elde edilen farklı ekstraktların (hegzan, metanol ve su) fenolik ve esansiyel yağ içerikleri, antioksidan ve sitotoksik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Serbest Radikaller

Oksidasyon canlı organizmalar için çok önemli bir süreçtir. Oksijen insanların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir moleküldür. Oksijenin eksik indirgenmesi ayrıca reaktif oksijen türlerinin de (ROS) oluşmasına sebep olmaktadır. Hücreyi tahrip eden bu reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hücre ölümüne sebep olmaktadır. Oksijenin bu yükseltgeyici özelliğinden anaeroplara yanısıra aeroplara da zarar görmektedirler (Davies, 2000; Köksal, 2007).

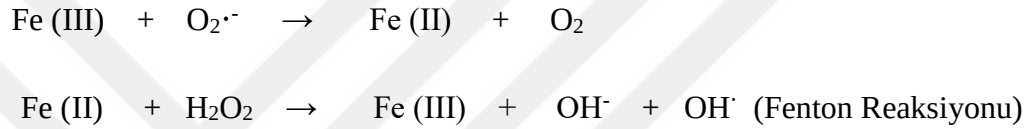
Dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır. (Halliwell, 1990).

Metabolizmadaki serbest radikallerin en büyük kaynağı reaktif oksijen veya nitrogen türleridir. Reaktif oksijen türleri endojen ve ekzojen kaynaklıdır. Endojen kaynaklar elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonlarıdır. Ekzojen kaynaklar ise UV ışınları, radyasyon, sigara kullanımı, yanlış beslenme ve kanserojen maddelerdir (Aksoy, 2002).

Tablo 2.1. Serbest radikal kaynakları (Gülçin, 2012)

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynaklar
Mitokondrial elektron transport zinciri	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Fagositik ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar	Zararlı ışınlar (x-ray, UV)
Otooksidasyon reaksiyonları	Ksenobiyotikler
Araşidonik asit metabolizması	İlaçlar
Enzimler (Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz)	Pestisitler

Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir (Ames vd., 1993; Gülçin, 2012). Ayrıca, singlet oksijen (1O_2), hidrojen persoksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$) gibi radikal olmayan fakat radikal öncüsü olan yapılar bu gruba dahil edilmektedir. H_2O_2 , geçiş metalleriyle reaksiyona girerek serbest radikallerin oluşumuna sebebiyet vermektedir. Fe (III) varlığına, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) bu element ile tepkimeye girerek Fe (II)'ye indirger. Akabinde, Fe (II)'de H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini ($OH^{\cdot}$) oluşturur. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir (Donaldson, 1994):



Öte yandan, H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ile de doğrudan reaksiyona girerek $OH^{\cdot}$ radikalini oluşturabilir ve bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (Draper, 1990; Donaldson, 1994):



$OH^{\cdot}$ en zararlı etkisi lipidler üzerinde gerçekleştirdiği lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu neticesinde membran yapısı, membran geçirgenliği ve hücre bileşenleri zarar gördüğünden hücre ölümüne kadar gidebilmektedir (Gülçin vd., 2003). Öte yandan, peroksidaz ve katalaz gibi enzimatik antioksidanlar hidrojen peroksiti (H_2O_2) hücrelerden uzaklaştırma görevini üstlenmişlerdir (Ahmad vd., 2008).

Tablo 2.2. Reaktif oksijen türleri ve serbest olmayan radikaller (Gülçin, 2012)

Radikal Yapılar		Radikal Oluşturan Yapılar	
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikali	$HO^{\cdot}$	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil radikali	$HOO^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid radikali	$L^{\cdot}$	Lipit hidroperoksit	$LOOH$
Lipid peroksil radikali	$LOO^{\cdot}$	Hipoklorit	$HOCl$
Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$	Peroksi nitrit	$ONOO$
Lipid alkoksil radikali	$LO^{\cdot}$	Diazot trioksit	N_2O_3
Azot dioksit radikali	$NO_2^{\cdot}$	Nitrik asit	HNO_3
Nitrik oksit radikali	$NO^{\cdot}$	Nitril klorür	NO_2Cl
Nitroksil katyon	NO^+	Nitroksil anyon	NO^-
Protein radikal	$P^{\cdot}$	Nitrik oksit	N_2O

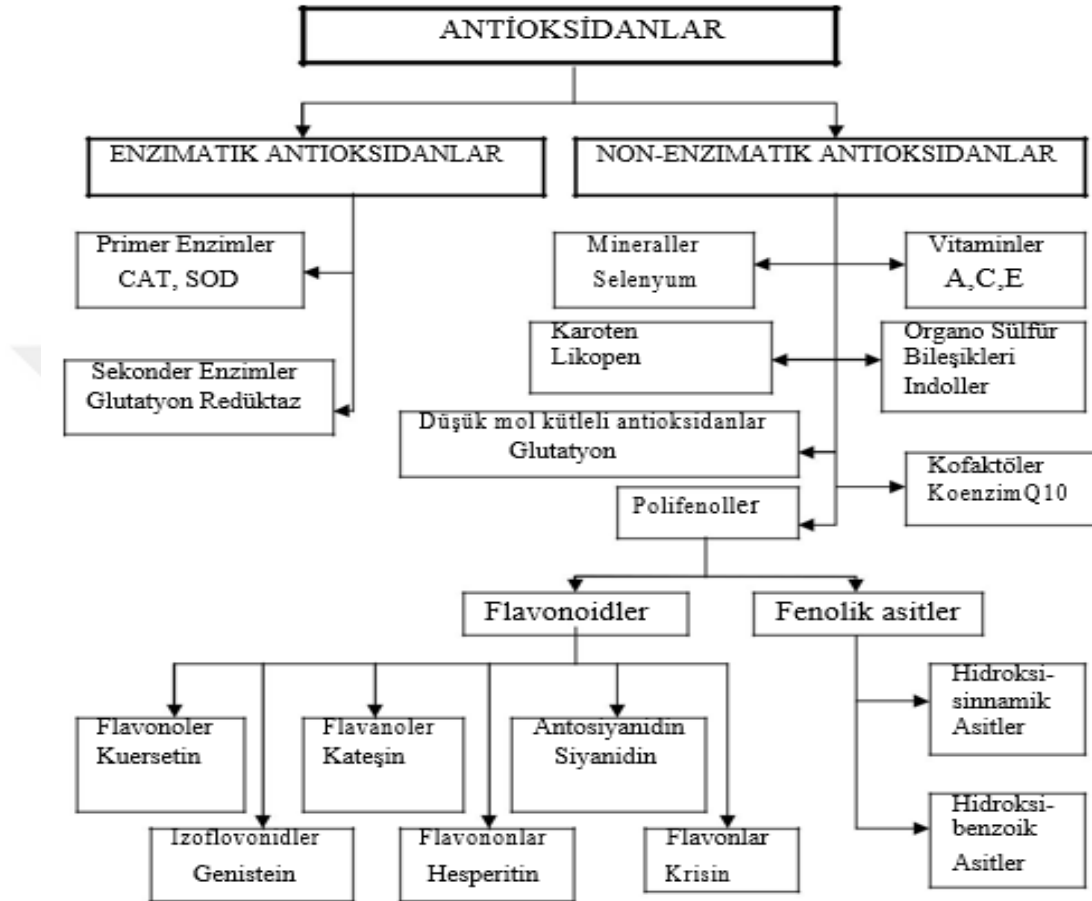
2.2. Antioksidanlar

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği tahribatları engellemek için hücreler antioksidan savunma sistemleri olarak bilinen bazı savunma mekanizmalarına sahiptirler. (Aksoy, 2016; Quintanilha vd., 1982).

Antioksidanlar, dört farklı yöntemle oksidanları etkisiz kılarlar (Gökpınar vd., 2006; Şit, 2011); 1) Temizleyici etki (Zintzen, 1997), 2) Söndürme etkisi (Packer, 1991), 3) Zincir kırıcı etki (Van-Der Meulen vd., 1997), 4) Onarıcı etki (Evelson ve Ordonez, 1997).

Antioksidanlar, yapılarına göre enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere 2 grupta sınıflandırılabilirler. Enzimatik olmayan antioksidanların birçoğu dışarıdan diyetle alınırlar. Bunlar; albumin, glutatyon, askorbik asid, α - tokoferol, β -karoten, koenzim Q10,

lutein, ürik asid, bilirubin ve birçok polifenolik bileşiklerdir. Enzimatik olan antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) gibi enzimleri içerirler (Sroka ve Cisowski, 2003).

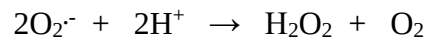


Şekil 2. 1. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması (Ratnam vd. 2006)

2.2.1. Enzimatik antioksidanlar

2.2.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit radikallerini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürür (Kwee vd., 1991).



SOD ailesinin tüm üyeleri aktif bölgelerinde metal iyonu bulundurlar. SOD'un genetik silinmesinin alt organizmalarda ölümcül mutasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Fridovich, 1989).

2.2.1.2. Katalaz (CAT)

CAT enzimi H_2O_2 moleküllerinden oluşabilecek $OH\cdot$ radikallerinin oluşmasını engellemektedir. (Gaetani vd., 1996). H_2O_2 molekülü bu enzimin varlığında oksijen ve suya parçalanır.



Katalaz enzimi aynı zamanda fenoller, formik asit, formaldehid ve alkoller gibi bileşikler üzerinde peroksidatif aktivite de gösterir. Bu reaksiyonda düşük molekül ağırlıklı alkoller, bir elektron donör görevi yaparlar (Shahidi, 1996).

2.2.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

GPx peroksit molekülleri (peroksit, hidrojen peroksit ve hidroperoksitler) alkollere indirgeyerek bu moleküllerden oluşabilecek hidroksil radikallerinin oluşumunu engeller (Sen ve Chakraborty, 2011). Buna ilaveten, hidroperoksitler tarafından hemoglobinin methemoglobine dönüşümü bu enzim tarafından engellenmektedir.

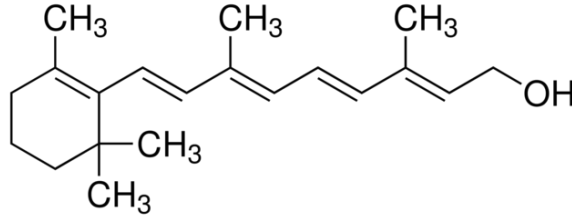
GPx, her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Redükte glutasyonu yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur. (Akkuş vd, 1996). Ayrıca GPx yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır (Jialal ve Grundy, 1993).

2.2.2. Non-enzimatik antioksidanlar

2.2.2.1. Vitamin A

A vitamini yağda ve organik çözücülerde çözünen fakat suda çok az miktarda çözünen bir vitamindir, ve bu vitaminin fazlası karaciğerde depolanır (Şekil 2.2.). Molekül yapısında çift bağlar bulunmaktadır ve bu bağlar havadaki oksijen tarafından kolaylıkla

oksitlenebilir ve bunun neticesinde aktivitesinde düşüş gözlenir. A vitamini görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığı gibi bir çok önemli fonksiyona sahiptir. Bu bileşiklere “*retinoidler*” de denir. Retinol, retinoik asit, retinal ve beta-karoten bu grupta bulunur.

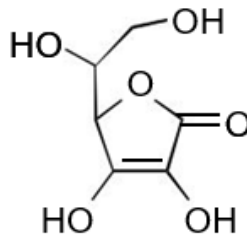


Şekil 2.2. A vitamini'nin kimyasal yapısı

β -C (provitamin A) ve retinoidler vitamin A'nın öncüsüdürler ve önemli biyo-antioksidanlardır. Bunlar polien zincir atomlarına bağlanarak veya polien zincir atomlarının α -karbonundan proton ayırarak serbest radikallerin giderilmelerini sağlarlar (Burton and Ingold 1984). Ayrıca, provitamin A ve retinoidler polien zincirinde singlet oksijen (1O_2) gibi uyarılmış moleküllerini etkisiz hale getirirerek antioksidan aktivitelerini sergilerler (Krinsky ve Deneke, 1982).

2.2.2.2. Vitamin C

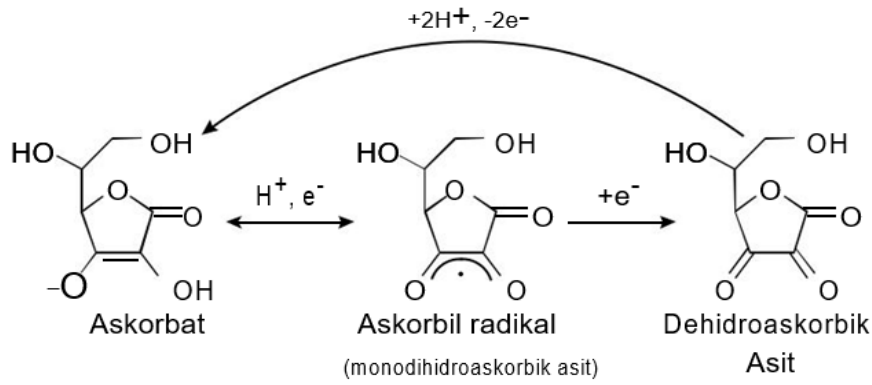
C vitamini insanlar için esansiyel (diyetle alınan) bir vitamin olup önemli bir antioksidandır (Şekil 2.3.). C vitamini lipidler, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarına yol açan reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerini azaltarak kardiyovasküler hastalıklar, kanser, felç, nörodejeneratif hastalıklar ve katarakt oluşumu gibi kronik hastalıkların oluşumunu da azaltır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).



Şekil 2.3. Askorbik asitin moleküler yapısı (Gerald vd. 2017)

Bir molekülün indirgeme kapasitesi onun antioksidan potansiyelinin bir göstergesidir. Oksidasyona uğrayan moleküller, indirgeme potansiyellerinin yüksek olmalarından dolayı askorbik asit tarafından indirgenebilirler. Bu sebeple askorbik asit antioksidan kapasite sergilemektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

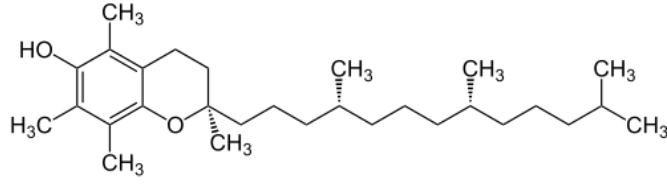
Bazı antioksidan bileşikler serbest radikalleri süpürecek veya nötralize edebilecek hidrojen atomlarına sahiptir. C vitamini serbest radikallere H atomunu vererek onları nötralize etmekte ve kendisinde “askorbat radikali” formuna dönüşmektedir. Ancak, askorbat radikalının rezonans yapısı onu oldukça kararlı kılmakta ve böylece serbest radikallere nispeten çok daha az reaktif özellik göstermektedir. (Buettner ve Jurkiewicz, 1996).



Şekil 2.4. Askorbik asitin indirgenme ve yükseltgenme mekanizmaları (Gerald vd. 2017)

2.2.2.3. Vitamin E

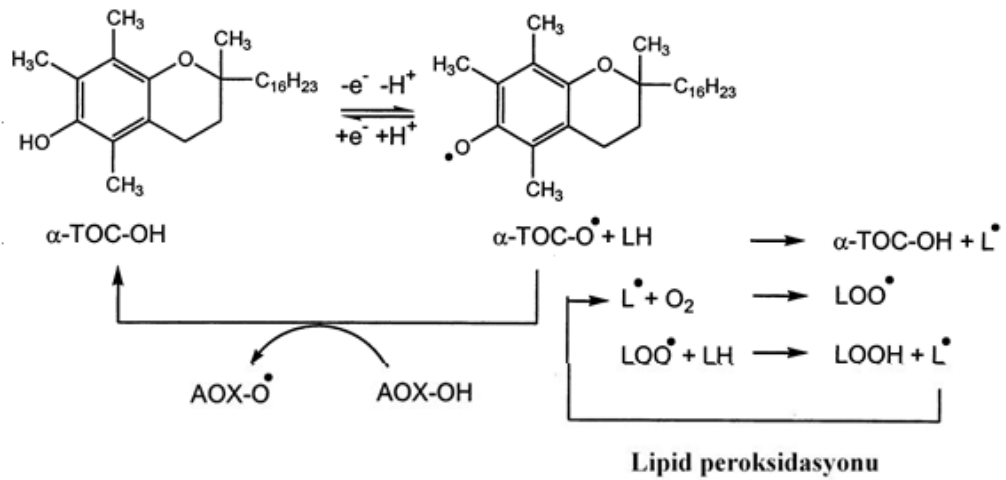
E vitamini, suda çözünmeyip yağ ve organik çözücülerde çözünen ve güçlü bir antioksidan aktivite sergileyen bir vitamindir (Şekil 2.5.). Metabolizmada birçok fonkiyona sahiptir bunlar arasında serbest radikalleri nötralize etmek, hücre membranlarının zarar görmesini önlemek ve hücre duvarını korumak gibi görevler sayılabilir. Ayrıca, alyuvarları korumak, kalp hastalıkları, katarakt ve bazı kanser türlerinin gelişimini engellemek gibi fonksiyonlarada sahiptirler.



Şekil 2.5. E vitamini'nin kimyasal yapısı

Vitamin E'nin serbest radikal süpürme ve endojen savunmayı onarma mekanizmalarından dolayı güçlü ve geniş bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Van-Der Meulen vd., 1997).

Tokoferoller antioksidan olarak bilinmelerine rağmen her koşulda koruyucu etki göstermezler (Frankel, 1980). Oksidatif stres koşullarında artan oranlarda α - tokoferol varlığında lipid peroksidasyonunu başlatabilen α -tokoferol radikalleri oluşur. Organizmada antioksidan oranı dengede olduğu durumlarda, diğer antioksidanlar tarafından α -tokoferol radikalleri tekrar α -tokoferole indirgenir ve pro-oksidan aktivitesi durdurulur (Rietjens vd., 2002). Ancak artan oksitadif stres koşulları altında, artan miktarda α -tokoferol ile meydana gelen α -tokoferol radikalleri daha fazla oluşacaktır ve organizmadaki diğer antioksidanlar bu radikalleri durdurmaya yeterli gelmeyecektir. E vitamini yaygın olarak güneş kremleri ve cilt kozmetiklerinde bulunduğundan kullanımına dikkat edilmelidir. Aşırı kullanımında cilt kanserlerine yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mitchel ve Mccann, 1993).

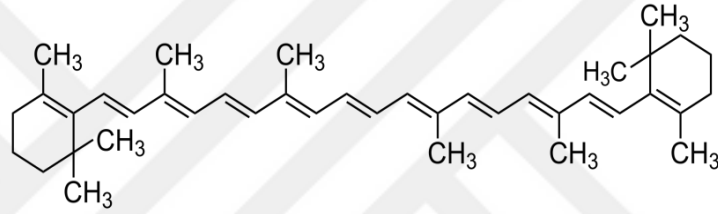


Şekil 2.6. Tokoferol'ün pro-oksidan aktivitesi (Frankel, 1980)

2.2.2.4. Karotenler

Yüksek bitkilerin kloroplastlarında bulunan ve genellikle klorofil ile maskelenen fakat bitkinin yaşlanmasıyla parçalanarak kloroplastlar sarı-portakal renkteki karotenoidleri ortaya çıkarmaktadırlar. Öte yandan, karotenoidler plastidlerde yarı-kristal yapılar halinde bulunmaktadır ve tetraterpen olarak sınıflandırılmaktadır Terpenler 5. karbona bağlanmış izopentandan oluşmaktadır (Kopsell ve Kopsell, 2006).

Karotenoidler yapılarında konjuge çift bağlar içerirler ve bundan dolayı singlet oksijeni bastırarak, serbest radikalleri süpürerek ve hidrojen peroksidin oluşumunu azaltarak güçlü bir antioksidan aktivite sergilerler (Gök ve Serteser, 2003; Anıl, 2006).



Şekil 2.7. Beta karotenin kimyasal yapısı (Köksal, 2007)

Karotenoidlerin düşük oksijen varlığında iyi bir antioksidan özellik sergilediği fakat oksijen konsantrasyonunun arttığı durumlarda bu özelliğini kaybettiği ve hatta prooksidan özellik gösterdiği belirtilmektedir. Nitekim, yüksek oksijen varlığında β- karotenin prooksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Von Elbe ve Schwartz, 1996). Karotenoidler düşük oksijen varlığında moleküler oksijene karşı koruyuculuğunun yanında lipid peroksidasyonunu da önlemektedir (Burton, 1989). Öte yandan, karotenoid konsantrasyonu da onun antioksidan gücünü etkileyebilmektedir. Nitekim, yüksek konsantrasyonlarda, karotenoidlerin antioksidan kapasitelerinde düşüş olduğu ve hatta prooksidan etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Paolini vd., 1999).

2.2.2.5. Fenolik bileşikler

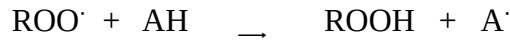
Fenolik bileşikler yapılarında en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu bulunduran bileşiklerdir. Yapısal olarak büyük

farklılıklarından dolayı fenolik bileşiklerin binlerce çeşidi bitkilerde tanımlanmış olup birinci derecede gerekli olmayan ikincil (sekonder) metabolitlerdir (Coşkun, 2006).

Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitlerde, hidroksi benzoik ve hidroksi sinamik asit olmak üzere iki gruba ayrılır. Salisilik asit, hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asit bileşikler hidrokşi benzoik asit grubuna örnek olarak verilebilir. Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asit ise hidroksi sinamik asitlere örnek olarak verilebilir (Balasundram vd., 2006).

Fenolik bileşikler antioksidan özelliklerini serbest radikalleri sonlandırıcı ve metal şelatlama gibi özellikleriyle gösterirler (Stevenson ve Hurst, 2007). Bazı bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler antioksidan olarak kabul edilmekte ve ticari olarak üretilmektedirler. Bitkiler antioksidan aktiviteleri başta flavonoidler olmak üzere sinamik asit türevleri ve kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

Fenolik bileşikler, yapılarında bulunan OH grupları vasıtasıyla oksidanlara H atomu vererek antioksidan özelliklerini sergilerler. Fenolik antioksidanlar lipid radikallerine H⁺ vererek lipid oksidasyonu ile etkileşirler. Ayrıca, peroksil (ROO[•]) ve alkoksil (RO[•]) radikallerini de parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlanmasını sağlarlar (Michalak, 2006).



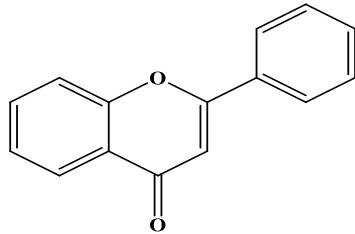
Neticede oluşan fenoksil radikali yeni bir radikal oluşumuna sebebiyet vermemeli veya zincir reaksiyonu ile oksidasyona maruz kalmamalıdır. Bu bağlamda, fenolik antioksidanlar mükemmel H⁺ ve e⁻ sağlayıcılarıdır. Fenoksil radikali çiftlenmemiş elektronların stabilitesini sahip olduğu aromatik halka etrafında lokalizasyon ile dengelenir. Fenolik asitler ve esterlerinin antioksidan kapasiteleri sahip oldukları OH

grubu sayısı ile artmaktadır (Feredioon vd., 1992). Orto veya para pozisyonundaki OH⁻ grupları fenolik bileşiğin antioksidan aktivitesini artırır.

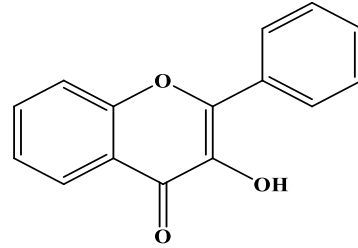
2.2.2.6. Flavonoidler

Flavonoidler, gıdalarda yaygınca bulunan ve gıdalara renklerini veren C₆-C₃-C₆ yapısında olan polifenolik bileşiklerdir (Formica ve Regelson, 1995). Flavonoidler, flavonlar ve izoflavonlar, antosiyanidinler ve proantosiyanidinler, flavanonlar, flavonoller, kateşinler, kalkonlar ve auronlar olarak gruplandırılabilir (Halfon, 2005). Antosiyanidinler, doğal renk maddeleridirler ve sebzelere, meyvelere, meyve sularını renklerini verirler (Vining, 1990).

Apigenin ve luteolin flavonlara örnek olarak verilebilir. Kaemferol, kuersetin, mirisetin, isoramnetin flavonollara örnek olarak verilebilir. Flavanonlar, yapılarındaki ortada bulunan halkada çift bağ içermemeleri ile flavonlardan ayrılmaktadırlar. Naringin, hesperidin, naringenin, elma ve armutta bulunan floretin ve floridzin örnek olarak verilebilir (Saldamlı, 2007).



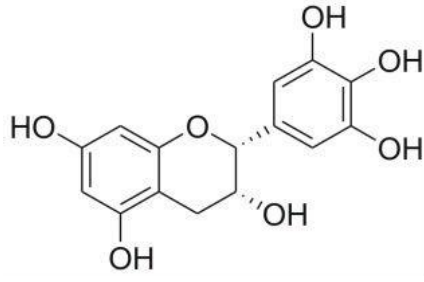
Flavon



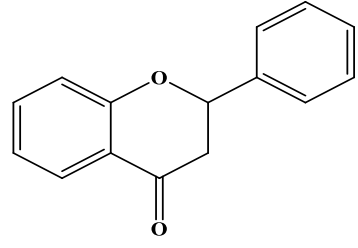
Flavonol

Şekil 2.8. Flavon ve flavonoidlerin kimyasal yapıları

Kateşinler gıdalarda yaygın olarak bulunan ve flavon-3-ol yapısına sahip flavonoid grubunu oluştururlar. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak hava oksijeni ile kolaylıkla kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar. Kateşin, gallokateşin, epikateşin, epigallokateşin bileşikler bu gruba örnek olarak verilebilir (Shahidi ve Naczki, 1995). Ayrıca, auronlar ve kalkonlar da flavonoidlerin önemli bir kısmını oluştururlar.

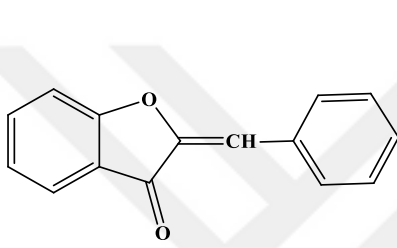


Kateşin

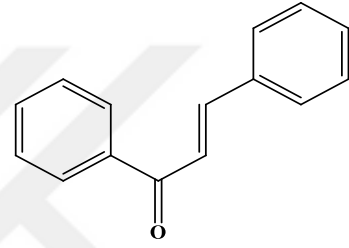


Flavanon

Şekil 2.9. Kateşin ve flavanon'ların yapıları



Auron



Kalkon

Şekil 2.10. Auron ve kalkonların kimyasal yapıları

2.3. Esansiyel Yağlar

Eterik yağlar ya da uçucu yağlar olarak bilinen esansiyel yağlar, bitkilerde tohum, meyve, çiçek, kök ve yaprak gibi kısımlardan farklı ekstraksiyon yöntemleri ile edilen ikincil metabolitlerdir (Bozarı, 2012; Hussain, 2009). Bu maddeler lipofilik maddeler olduğundan hücre zarından kolaylıkla geçebilirler ve sentezlendikleri bölgelerden bitkinin diğer organlarına floemle taşınırlar. Bitkide savunma aracı olarak kullanılan bu bileşikler, floemi hedef olarak seçen afid gibi parazit canlıları doğrudan etkilemek suretiyle bitkiyi koruyabilirler ya da taşındıkları yaprak veya primer gövde kısımlarının heterotrof canlılar tarafından tüketilmesine karşı benzer şekilde koruma sağlayabilirler. Ancak bitkiler bu kimyasalları sadece bünyelerinde bulundurarak savunma yapmazlar. Yapraklardan ya da kökten salıverme yoluyla uçucu yağların eksüdasyonu sağlanabilir. Bir kısmı aromatik olan bu bileşenler bir yandan çekici özellikleriyle hayvanları cezbederken diğer yandan yakınında bulunan bitkilere, köklerine yakın yaşayan

bakterilere, mantarlara veya bitkilere karşı tehdit oluşturmak suretiyle kendilerini korurlar. Bu etki allelopatik etkidir (Bozari, 2012).

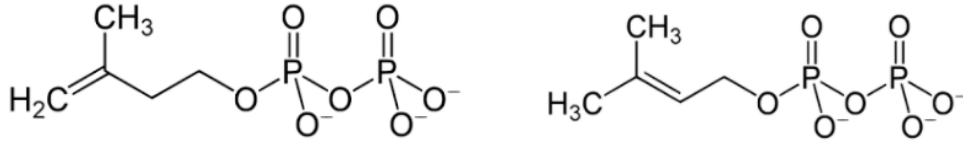
Esansiyel yağlarda çeşitli kimyasal sınıflardan bulunan bileşenler baskın olarak terpenlerdir, fakat fenilpropanoidler, yağ asitleri ve diğer bileşenler her zaman olmasa da mevcuttur. Bu hidrokarbonlar ve oksijenli türevleridir ve ayrıca azot ve kükürt içerebilirler. Bu bileşikler genel olarak düşük kütleli moleküllerdir ve sudaki çözünürlükleri sınırlıdır (Griffin vd., 1999; Weidenhamer vd., 1993)

Esansiyel yağların sınıflandırılması ve adlandırılması, çoğunun sistematik kimyasal sınıflandırılmasından önce izole edildiği ve çalışıldığından dolayı karmaşıktır. Sonuç olarak birçoğu sistematik olmayan, sıradan ya da yaygın olarak bilinen isimleri ile tanınırlar (Obst, 1998).

2.3.1. Terpen türevleri

Terpenler doğal bileşiklerin en geniş grubudur ve 30.000 'den fazla terpen yapısı bilinmektedir (Breitmaier, 2006; Dubey vd., 2003). Terpen ismi bu sınıfın ilk tanımlanan üyelerinin izole edildiği, monoterpenlerce zengin çam (*Pinus* spp.) reçinesinden elde edilen Turpentine'den gelir (Breitmaier, 2006).

Terpenlerin bitkilerde sentezlenmesi, iki farklı, çoğunlukla bölümsel olarak ayrılmış, biyolojik yollarla gerçekleşir (Dubey vd., 2003). Mevalonik asit yolu ilk önce tarif edilmiştir ve ağırlıklı olarak sitoplazma, endoplazmik retikulum ve mitokondride seskiterpenleri, steroller ve ubikinonları ağırlıklı olarak üretir. Dikkat çekici bir şekilde, ikinci yolun varlığı ve rolü nispeten doğrulanmış ve karakterize edilmiştir. Metabolik olmayan asit veya metil-eritritol fosfat yolu olarak bilinen bu yol, karotenoidler ve klorofil fitoller gibi esansiyel yağlarda bulunmayan diğer yüksek terpenlere ilaveten çok yönlü hücreler ve karbondioksitin sentezini sağlar. Her iki yol da, terpenlerin temel yapı taşları olan isopentenildifosfat (IPP) ve izomeri dimetil allildifosfat (DMAPP) üretmektedir (Croteau vd., 2000; Keszey vd., 2008; Thormar, 2011).



Şekil 2.11. İsoentenildifosfat (IPP) ve izomeri dimetil allildifosfat (DMAPP) yapıları

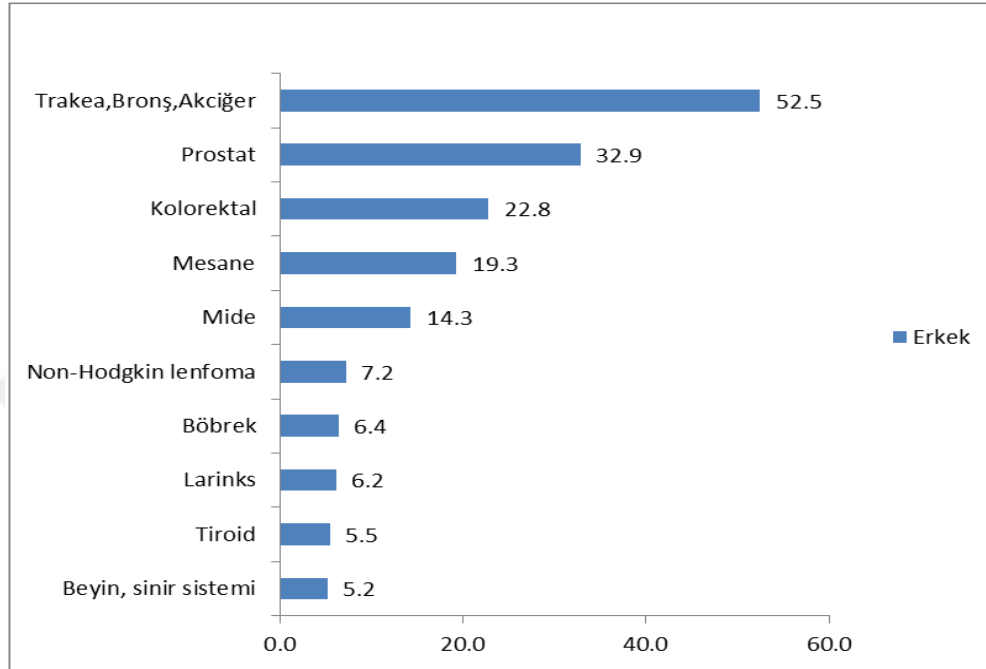
2.4. Kanser

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması kanser olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücrelerinin en karakteristik özellikleri, bağımsız olarak yaşayabilme yetenekleri, kontrolsüz çoğalabilmeleri kan ve lenf dolaşımı aracılığıyla diğer sağlıklı doku ve organlara taşınıp metastaz yaparak da sağlıklı dokuların işlevlerini etkisiz hale getirebilmeleridir. Kanseri tehlikeli kılan, tüm bu olayların bir araya gelmesidir. Kanseri hücrelerin yapılarında birçok değişiklik oluşur. Bunun yanında hücrede düzenli yapılan görevlerde de değişimler görülür. Kanseri hücreler, sağlıklı normal bir hücre iken yaptıkları görevleri yapamaz ya da bazı yeni görevler edinirler. Çoğalıp yayılarak diğer organlara taşınan bu hücreler, fizyolojik dokunma ile çoğalma yeteneğinin baskılanma mekanizmasını kaybederler, hücrelerden gelen sinyallere yanıt vermeyip apoptoza da girmezler (Aslan, 2010).

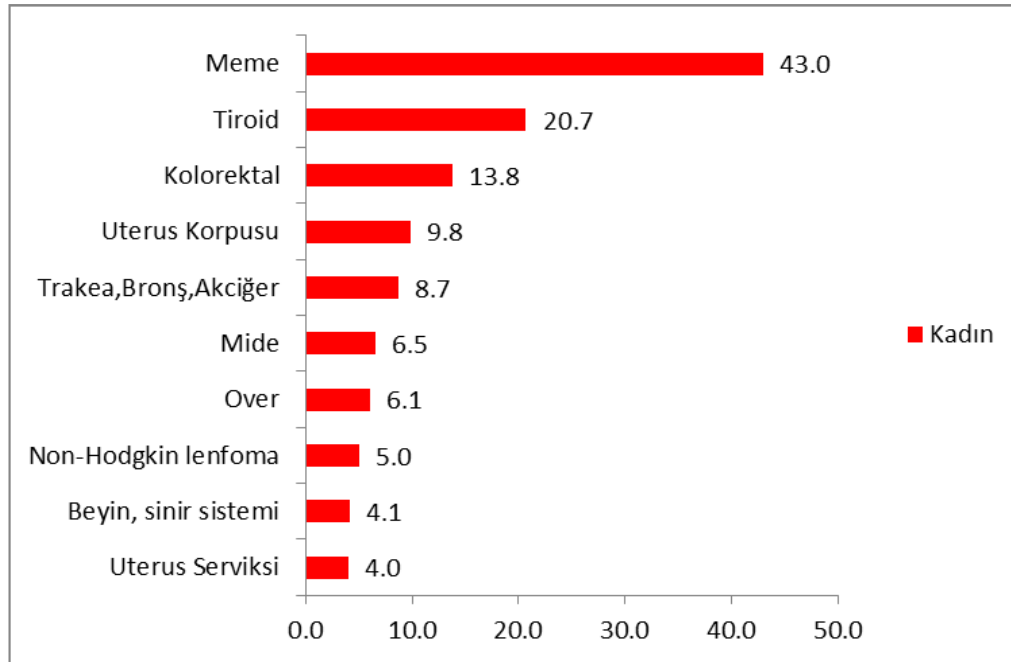
Kanserin oluşumunda değiştirilebilen ve değiştirilemeyen risk faktörleri rol oynamaktadır. Değiştirilemeyen faktörlere yaş, cinsiyet ve aile öyküsü örnek olarak verilebilirken değiştirilebilen faktörlere ise sigara ve alkol tüketimi, radyasyon, virüsler, kötü beslenme, gıda katkı maddeleri, UV ışınları, bazı kimyasal maddeler ve hava kirliliği örnek olarak verilebilir (hsgm.saglik.gov.tr).

Kanser tiplerinin görülme sıklığı erkek ve kadınlarda ve farklılık göstermekle birlikte coğrafi bölgelere ve ırklara göre de bu sıklıkta farklılıklar gözlenmektedir. Cilt kanseri hem erkeklerde, hem kadınlarda en çok görülen kanser çeşididir. Türkiye'de bu kanser çeşidini erkeklerde sırasıyla akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas kanserleri izlerken kadınlarda ise meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri izlenmektedir. Son yıllarda, nüfus içindeki yaşlı birey sayısının artması ve sigara içenlerin sayısındaki artışa paralel olarak, kanser vakalarının

görölme sıklığında ciddi bir artış gözükmemektedir. Hatta, kadınlarda sigara kullanımının yaygınlaşması neticesinde akciğer kanserinin görölme sıklığı meme kanserine yaklaşmıştır (hsgm.saglık.gov.tr).



Şekil 2.12. Erkeklerde en sık görölven kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları (hsgm.saglık.gov.tr).



Şekil 2.13. Kadınlarda en sık görölven kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları (hsgm.saglık.gov.tr).

2.5. Bitki Familyası

Türkiye’de Caryophyllaceae familyasının 35 cinsi bulunmaktadır. Gypsophila, familyanın Türkiye’deki üçüncü büyük cinsini oluşturmaktadır (Korkmaz vd., 2010).

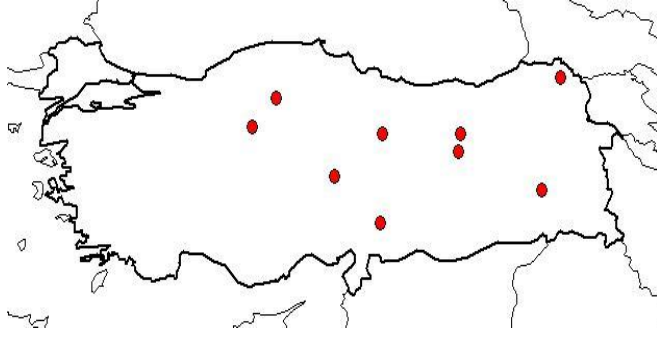
Türkiye’de genel olarak çöven, çöğen, helvakökü, sabunotu gibi adlarla bilinen Gypsophila taksonları yapılarında barındırdıkları saponin bileşiklerinden dolayı temizlik ve gıda başta olmak üzere pek çok sanayi dalında kullanılmaktadırlar (Korkmaz ve Özçelik, 2011a; b).

Gypsophila taksonları genelde İran-Turan elementidir. Türkiye’nin Orta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir (Korkmaz ve Özçelik, 2011a). Türkiyede Gypsophila taksonlarının en çok yayılış gösterdiği yerler İç Anadolu’nun jipsli alanlarıdır (Geven vd., 2009; Hamzaoğlu, 2006).

Sivas-Çankırı, Sivas-Erzincan ve Ankara-Eskişehir arasında geniş jipsli alanlar bulunmaktadır (Akpulat ve Çelik, 2005). Bu alanların tarım ve hayvancılığa olanak sağlamaması, endemik taksonlar için doğal bir koruma ortamı oluşturmaktadır (Akpulat ve Çelik, 2005). Erzincan, Sivas ve Ankara güzergahı (Şekil 2.15.) bu cinsin önemli yayılış alanlarını oluşturmaktadır (Korkmaz ve Özçelik 2011a).



Şekil 2.14. *Gypsophila sphaerocephala* bitkisi



Şekil 2.15. *Gypsophila sphaerocephala* türünün Türkiye'deki yayılış alanları

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Hassas terazi (Shimadzu, ATX224), manyetik karıştırıcı (MR Hei-Standart), kompresör (Rocker 300 Modd), Evaporatör (Heidolp), HPLC (Thermo UltiMate 3000), GC-MS (Thermo Scientific), santrifüj (Isolab 5810 R), CO₂ inkübatör (Nüve, EC160), ters faz kontrast mikroskopu (Nikon Eclips Tİ-U), pH ölçer (Mettler Toledo, ABD), spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 35), -80 °C dondurucu (Haier, DW-86L628), -20 °C (Haier, DW-40L508), ELISA plaka okuyucusu (Epoch, BioTek), su banyosu (Nüve, ST30-22), ultrasonik banyo (Isolab), biyogüvenlik kabini (Bilser BLF 200).

3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler

Antioksidan aktivite ve fenolik içerik tayininde kullanılan kimyasallar; Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich-Germany), AlCl₃ (Sigma-Aldrich-Germany), NaNO₂ (Sigma-Aldrich-Germany), Gallik asit (Sigma-Aldrich-Germany), Trolox (Sigma-Aldrich-Germany), DPPH· (Sigma-Aldrich-Germany), ABTS· (Sigma-Aldrich-Germany), Etanol (Sigma-Aldrich-Germany), EDTA (Sigma-Aldrich-Germany), K₂S₂O₈ (Merck-Germany), Folin Ciocalteu reaktifi (Merck-Germany), NaOH (Merck-Germany), EDTA (Fluka, Switzerland), Dimetil sülfoksit (Sigma-Aldrich-Germany), CuCl₂ (Merck-Germany), Neokuprin (Merck-Germany), Ferrozin (Sigma-Aldrich-Germany), FeCl₂ (Sigma-Aldrich-Germany), CH₃COONH₄ (Merck-Germany), BHA (Sigma-Aldrich-Germany), BHT (Sigma-Aldrich-Germany), troloks (Merck-Germany), α-tokoferol (Merck-Germany), 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich-Germany). Tripan mavi boyası (Biological Industries, Israel), XTT kiti (Biological Industries, Israel). Ayrıca, HPLC analizlerinde kullanılan standart fenolik bileşikler ve çözücüler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hatları ve besiyerleri; insan meme kanser hücre hattı (MCF-7), kolon kanser hattı (HT-29) ve hepatokarsinoma hattı (HepG2) ATCC (American Type Culture Collection, LGC Promochem, UK) firmasından ticari olarak temin edilmiştir. Büyüme ortamı olarak Eagle's Minimum Essential Medium

(EMEM) ve McCoy's 5A besiyerleri kullanılmıştır. Ayrıca, bu besiyerlerine %1 L-Glutamine (Lonza, Belgium), %10 fetal bovine serum (Lonza, Belgium) ve %1 penicillin-streptomycin (Pen Strep) takviye edilmiştir. Yıkama ortamı olarak PBS (Lonza, Belgium) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.1. Toplam fenolik miktar tayini

Na₂CO₃ çözeltisi (%2): 2 gr Na₂CO₃ tartıldı bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteu reaktifi (%20): Folin-Ciocalteu reaktifi saf su ile % 20'lik olarak hazırlandı.

3.1.3.2. Toplam flavonoid miktar tayini

NaNO₂ çözeltisi (%5): 5 g NaNO₂ tartıldı bir miktar saf suda çözüldü son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

AlCl₃ çözeltisi (%10): 10 g AlCl₃ tartıldı bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

NaOH çözeltisi (1 M): 4 g NaOH tartıldı bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. DPPH[•] radikal giderme aktivitesi

DPPH[•] Radikali (0.1mM): 5 mg DPPH[•] radikali tartıldı ve 100 ml etanol içerisinde çözüldü.

3.1.3.4. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi

ABTS çözeltisi (7 mM): 76,8 mg ABTS saf suda çözüldü ve toplam hacmi saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.

K₂S₂O₈ çözeltisi (2,45 mM): 13,25 mg K₂S₂O₈ tartıldı, bir miktar saf suda çözündü ve son hacmi saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.

ABTS⁺ serbest radikal çözeltisi: 20 mL 7 mM ABTS ve 20 mL 2,45 mM K₂S₂O₈ 1:1 oranında karıştırıldı, 734 nm'de yaklaşık 0,70 birim absorbans verinceye kadar metanol ile seyreltildi.

3.1.3.5. Metal şelatlama kapasite tayini

FeCl₂x4H₂O çözeltisi (2 mM): 19,8 mg FeCl₂x4H₂O tartılıp saf suda çözündü ve toplam hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Ferrozin çözeltisi (5 mM): 123 mg ferrozin tartıldı, bir miktar saf suda çözündü ve toplam hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.6. Bakır indirgeme (Cu²⁺-Cu⁺) kapasitesi tayini

CuCl₂ çözeltisi (0,01 M): 47 mg CuCl₂ tartıldı bir miktar saf suda çözöldü ve son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Neokuprin çözeltisi (7,5x10⁻³ M): 78 mg neokuprin tartıldı ve son hacim 50 ml olacak şekilde etanolde çözöldü.

CH₃COONH₄ tamponu (1 M; pH:6,5): 7,7 g CH₃COONH₄ tartıldı bir miktar saf suda çözöldükten sonra pH'sı 6,5'e ayarlandı ve akabinde son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Gypsophila sphaerocephala* türünün toplanması, kurutulması ve ekstraksiyonu

Bu çalışmada kullanılan *Gypsophila sphaerocephala* türü 25.06.2017 tarihinde Erzincan ili, Tercan ilçesi 1516 m rakımlı Çingene yamaçlarından toplandı. Toplanan bitki türü Doç. Dr. Mustafa Korkmaz tarafından taksonomik olarak teşhis edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında güneş ışığıyla temassız bir ortamda kurutulduktan sonra çiçek kısımları toplandı ve sıvı azot kullanılarak toz haline getirildi. Bitkinin beş farklı ekstresi hazırlandı. Bunun için toz haline getirilen bitki beş ayrı balon içerisine alındı ve

miktarlarının beş katı olacak şekilde sırası ile hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol ve su çözücülerini eklendi manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı. Elde edilen ekstraktlar Whatman kağıdı ile süzüldü. Çözücülerini evaporatörde uzaklaştırıldı. Numuneler -80 °C’de donduruldu ve 48 saat liyofilize edildi. Deneysel çalışmalarda kullanılacak olan numuneler koyu renkli şişelerde -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.2. Antioksidan aktivite tayin metotları

3.2.2.1. DPPH[•] radikalini giderme aktivitesi tayini

Bitki ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktivitesi tayini Blois (1958) metodu ile gerçekleştirildi. Özetle, 96 kuyucuklu plaka içerisine 210 µL DPPH[•] radikali eklendi. Üzerine metanol ve su ekstraktları’ndan değişen konsantrasyonlarda 15 µL (kör için 15 µL metanol) eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbans okuması gerçekleştirildi. Absorbanstaki azalış tüp içerisindeki geriye kalan DPPH[•] miktarını yani ekstrenin serbest radikal giderme kapasitesini vermektedir. Bu çalışmada standart antioksidan kaynağı olarak troloks, α-tokoferol, BHA ve BHT kullanıldı. Sonuçlar, IC₅₀ (mg/ml) değerleri olarak ifade edildi. IC₅₀ başlangıçtaki ilk DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gerekli antioksidan miktarı ifade etmektedir. Her bir test en az üç kez tekrar edildi.

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

Bitki ekstraktlarının ABTS^{•+} radikal giderme kapasiteleri Re ve arkadaşlarının (1999) metoduna göre gerçekleştirildi. İlk olarak ABTS^{•+} radikali oluşturmak için 7 mM ABTS çözeltisi 2,45 mM potasyum persulfat (K₂S₂O₈) çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak reaksiyona sokuldu. Radikal kullanılmadan önce 16 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. 96 kuyucuklu plaka içerisine metanol ve su ekstraktları’ndan 2,5 µL ve üzerine seyreltilmiş ABTS^{•+} radikalinden 250 µL eklendi, karıştırıldı ve 6 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyondan sonra 734 nm’de absorbans okuması gerçekleştirildi. Standart olarak troloks, α-tokoferol, BHA ve BHT kullanıldı. Sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak ifade edildi. Her bir test en az üç kez tekrar edildi.

3.2.2.3. Metal şelatlama kapasite tayini

Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu plaka içerisine 50 µL ekstre/EDTA eklendi. Üzerine 185 µL saf su ve 5 µL 2 mM FeCl₂ eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 µL 5 mM Ferrozin eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 562 nm’de absorbans okuması gerçekleştirildi. Bu metotta EDTA standart olarak kullanıldı. Sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak ifade edildi. Her bir test en az üç kez tekrar edildi.

3.2.2.4. Bakır indirgeme kapasite tayini

Bitki ekstralarının bakır indirgeme kapasiteleri, Apak ve arkadaşlarının (2004) metoduna göre yapıldı. Bunun için ekstraların farklı konsantrasyonları hazırlandı (10-20-30 µg/ml). Akabinde, her bir deney tüpüne sırasıyla 0,25 ml CuCl₂ çözeltisi (0,01 M), 0,25 ml etanolik neokuprin çözeltisi (7,5x10⁻³ M) ve 0,25 ml CH₃COONH₄ (1 M) tampon çözeltisi eklendi ve 30 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm’de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu metotta standart antioksidan kaynağı olarak troloks, α-tokoferol, BHA ve BHT kullanıldı.

3.2.3. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini

3.2.3.1. Toplam fenolik miktarı tayini

Gypsophila sphaerocephala türünün toplam fenolik miktar tayini Singleton ve Rossi (1965) metodu ile gerçekleştirildi. Özetle, 96 kuyucuklu plaka içerisine 200 µL %2’lik Na₂CO₃ eklendi. Üzerine 0,031 – 1 mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan metanol ve su ekstralarından 10 µL (kör için 10 µL metanol) eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra 10 µL % 20’lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 750 nm’de absorbans okuması gerçekleştirildi. Standart olarak gallik asit kullanıldı. Oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiğinden ekstraların sahip olduğu toplam fenolik miktarı tespit edildi. Toplam fenolik miktarı mg GAE/g ekstre olarak ifade edildi. Sonuçlar üç kez tekrarlanarak standart sapmalarla birlikte verildi.

3.2.3.2. Toplam flavonoid miktarı tayini

Gypsophila sphaerocephala türünün toplam flavonoid miktarı tayini Zhishen ve arkadaşları (1999) tarafından tanımlanmış olan metoda göre gerçekleştirildi. Özetle, 96 kuyucuklu plaka içerisine 128 µL saf su konuldu. Üzerine 0,25-2mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan metanol ve su ekstrelerinden 10 µL (kör için 10 µL metanol) eklendi. 6 µL %5 NaNO₂ eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 6 µL %10 AlCl₃ eklendikten sonra tekrar 6 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak 40 µL 1 M NaOH eklendi ve 415 nm'de absorpsiyon okuması gerçekleştirildi. Standart olarak kuarsetin kullanıldı. Oluşturulan kuarsetin kalibrasyon eğrisi grafiğinden ekstrelerin sahip olduğu toplam flavonoid miktarı tespit edildi. Toplam flavonoid bileşik miktarı mg QE/g ekstre olarak ifade edildi. Sonuçlar üç kez tekrarlanarak standart sapmalarla birlikte verildi.

3.2.4. *Gypsophila sphaerocephala* türünün fenolik içeriğinin RP-HPLC analizleriyle belirlenmesi

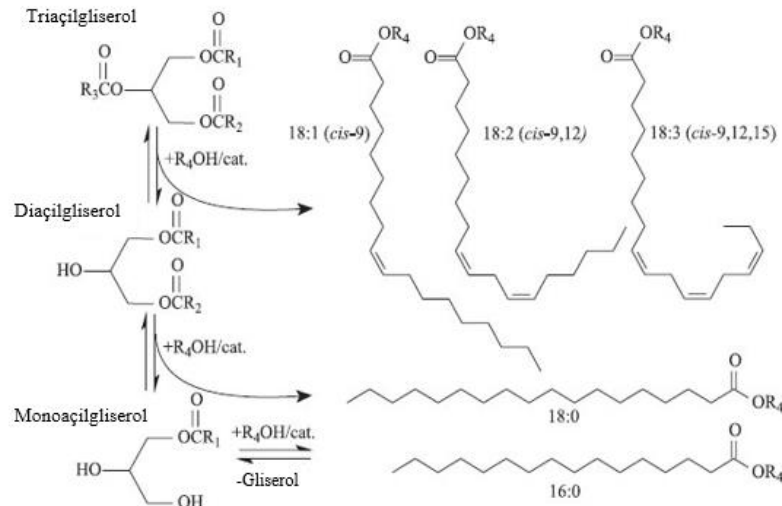
HPLC analizi, UltiMate 3000 Pump, UltiMate 3000 Autosampler Sütun Bölmesi, UltiMate 3000 Photodiode Array Detector ve Chromeleon yazılımı ile donatılmış bir Dionex UltiMate 3000 HPLC sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayırıştırma aynı malzeme ile paketlenmiş bir koruma sütunu ile bir Agilent Zorbax SB-C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz boyunca kolon 30 °C'de tutuldu ve UV tespiti için dalga boyu olarak 280 nm seçildi. Gradyan elüsyonu, 30 °C'de 1.0 mL/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz, aşağıdaki gibi bir gradyan elüsyonu kullanılarak (A) metanol: su [% 50 (hacim/hacim)] ve (B) su: asetik asit [98:2] 'den oluşmuştur:

0 - 3 dk, % 0 B; sonraki 3-5 dk, % 8 B; sonraki 5-57 dakika, A-B'den (92: 8) A-B'ye (28:72) doğru doğrusal değişim, daha sonra 57-60 dak. % 100 A'ya geri dönüş. Tüm örnekler bir 0.45 µm membran filtreden (Millipore, Milford, MA) süzüldü. Süzüntüye 20 µL'lik bir alikot, analiz için HPLC'ye enjekte edildi. Her bir standart fenolik bileşik ve bitki ekstresi için üç HPLC replikat enjeksiyonları yapıldı.

3.2.5. *Gypsophila sphaerocephala* türünün esansiyel yağ profilinin GC-MS ile belirlenmesi

G. sphaerocephala türünün esansiyel yağ profilinin analizde kullanılan sistem gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi sistemidir (GC-MS). Bunun için kullanılan sistemde; 15 m x 0.25 mm x 0.25 µm film kolon kullanıldı. Dedektör olarak MS- Electron İmpact dedektör kullanıldı. Sistem aplikasyonu 40-320 °C sıcaklık aralığında 5 °C/dk artacak şekilde sıcaklık gradienti oluşturuldu.

Bitkinin esansiyel yağ profilinin belirlenmesinde hekzan ekstresi kullanıldı ve bunun için ekstre Uluslararası Yağ Komisyonu (IOOC) ve IUPAC tarafından yayınlanan trans esterifikasyon prosesi raporlarına göre türevlendirilerek metil esterlerine dönüştürüldü (Paquat vd., 1992). Bu prosedüre göre 5 mL'lik bir vidalı kapaklı test tüpü içerisine yaklaşık olarak 0.1 g kuru hekzan ekstresi kondu. 2 mL hekzan eklenip sallayarak hekzan ekstresi çözüldü. Daha sonra oda sıcaklığında 0.2 mL 2M Metanolik KOH eklenip kapağı kapatıldı ve 30 saniye vorteksenerek homojenize edildi. Üst faz berraklaşınca kadar fazlar ayrılmaya bırakıldı. Metil esterleri içeren üst kısım dekantasyon ile alındı ve GC-MS ile analiz edildi. Triaçilgliserollerin esterifikasyon reaksiyonları Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Triaçilgliserollerin esterifikasyonu (Freedman vd., 1986)

3.2.6. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.6.1. Hücre kültürü koşulları

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar koşullarında kontrollü olarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemle hücrelerin daha hızlı bir şekilde yetiştirilmesi ve çoğaltması sağlanmakta ve birçok moleküler ve biyokimyasal çalışmanın da çoğaltılan bu hücreler üzerinde uygulanması sağlanmaktadır. (King, 2013).

Bu tez çalışmasında üç farklı hücre hattı kullanılmıştır; HT-29 (kolorektal adenokarsinoma), MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) ve HepG2 (hepatokarsinoma). HepG2 ve MCF-7 hücre hatları, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep) çözeltisi içeren EMEM besiyeri içerisinde kültüre edildi. HT-29 hücreleri ise yine %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep) çözeltisi içeren McCoy's 5A ortamında kültüre edildi. Kültürler % 5 karbon dioksit (CO₂) ve % 95 nem ile 37 °C' de inkübe edildi. Hücre kültürü çalışmaları Biyo Güvenlik Kabininde (Sınıf II) yapıldı.

3.2.6.2. Hücrelerin çözündürülmesi

Sıvı azottan alınan kriyo tüpler 37°C su banyosunda çözündürüldü ve T75 hücre kültürü flasklarına aktarıldı ve üzerlerine büyüme ortamını sağlamak için 7-8 mL taze besi yeri ilave edildikten sonra CO₂ inkübatöründe (37°C) inkübasyona bırakıldı.

3.2.6.3. Hücrelerin pasajlanması

Belirli bir konfluense (% 80) ulaşan hücrelerin içerisindeki bulundukları besi yeri ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 4-5 ml PBS tamponu ile yıkandı. Akabinde, flask içerisinde taabana yapışık olarak büyüyen hücrelerin tabandan kaldırılması için 3-4 ml tripsin/EDTA ilave edildi ve 5-10 dk. süresince CO₂ inkübatöründe inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi tamamlandığında tripsininin etkisini gidermek için 8 ml taze besiyeri ilave edildi. 800 x g de 5 dk. Santrifüj edilen hücre süspansiyonundan süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 10 ml taze besiyeri ilave edildi ve 4 adet yeni T75 flask içerisine dağıtıldı. Pasajlanan bu hücre kültürleri 37° C' de, % 95 nem içeren % 5 CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı.

3.2.6.4. Hücrelerin dondurulması

Pasajlanan hücreler belirli bir doluluğa (%80) ulaştıklarında deney aşamalarında kullanılmaları amacıyla dondurulma işlemine tabi tutuldu. Bunun için, CO₂ inkübatöründen alınan flasklar içerisindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve 4-5 ml PBS tamponu ile yıkandı. Flask içerisinde tabana yapışık olarak büyüyen hücrelerin tabandan kalkması için üzerine tripsin/EDTA solüsyonundan 2-3 ml konuldu ve hücre tipine bağlı olarak 5-10 dk CO₂ inkübatöründe inkübasyonuna tabi tutuldu. Inkübasyon süresi tamamlandığında tripsinin inaktivasyonu için flask içerisine 8-10 ml taze besi yeri ortamı ilave edildi. Akabinde, hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı ve 37° C de, 800 × g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra, pelet tam bir büyüme ortamında (% 10 DMSO içeren 3 ml dondurma ortamı) yeniden süspansiyon hale getirildi ve 1.5 ml'lik kriyotüplere aktarıldı ve hemen - 80 °C dondurucuya konuldu. Bir gün sonra, kriyotüpler sıvı azot buharında bekletilmek suretiyle -196 °C de sıvı azot tankında aktarıldı.

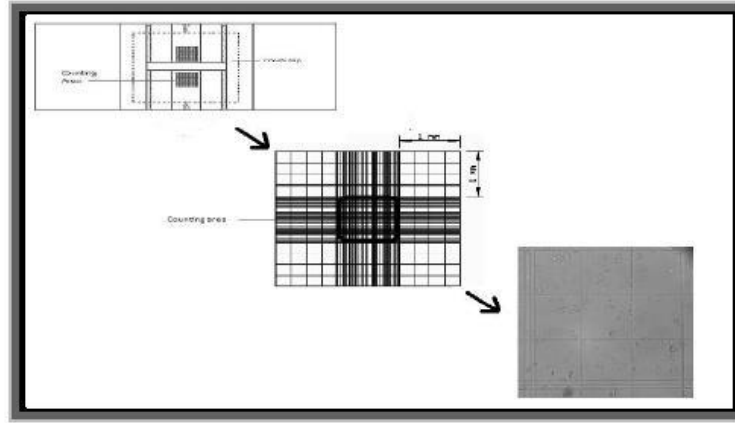
3.2.6.5. Hücre sayımı

Canlı ve cansız hücreleri birbirinden ayırt etmek ve hücre sayısını belirlemek için kullanılan tripan mavisi boya dışlama tekniğinde cansız hücreler boyayı içine aldığından mavi renkli gözükürken canlı hücreler bu boyayı dışladığından parlak renkli gözükmektedir. Sayımı yapılacak hücre süspansiyonundan küçük bir miktar alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve tripan boyası ile yoğunluğa bağlı olarak belirli oranda karıştırıldı ve hemositometrenin her iki odacığına 10 µl aktararak inverted mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Hücre konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi:

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

DF : Seyreltme faktörü.

10⁴ : Toma lamındaki odacık boyutlarından kaynaklanan faktör. (Hemositometredeki her odanın boyutları 1 cm uzunluğunda, 1 cm eninde ve 0,1 cm yüksekliktedir. Hacim 0,1 cm³ veya 1 mm³ tür.)



Şekil 3.2. Hemositometre ile hücre sayımı

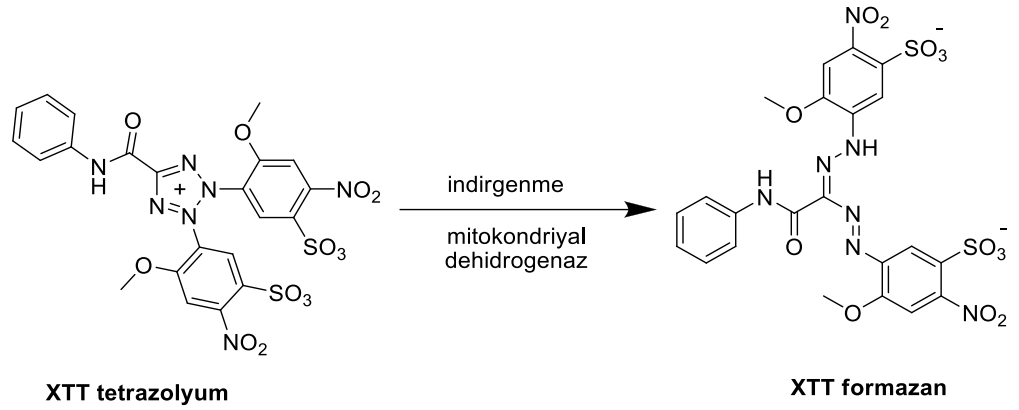
3.2.7. Antiproliferatif aktivite testleri

3.2.7.1. Ekstrelerinin hazırlanması

Bitkinin su ve metanol ekstrelerinin antiproliferatif aktivitelerini belirlemek için kuru toz haline getirilen ekstrelerden 5 mg/ml ana stok çözeltiler hazırlandı. Bunun için her bir ekstreten 20 mg tartıldı ve % 0,2 DMSO içeren 4 ml besi yeri içerisinde çözüldü. Daha sonra bu stoklar besi yeri ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (5000-100 µg/ml) hücre süspansiyonları hazırlandı.

3.2.7.2. XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü

Örneklerin mevcut hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri XTT kitiyle ve üretici firmanın talimatlarına göre uygulandı (Hücre Proliferasyon XTT Kiti, BI). Bu metoda göre metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal enzim aktivitesi ile suda çözünmeyen XTT tetrazolyum tuzu suda çözünebilen turuncu renkli formazan bileşiğine indirgenmektedir ve oluşan bu ürün 450-490 nm aralığında ELISA okuyucuda kolaylıkla nicelleştirilebilmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. XTT tetrazolyum fenazin metosülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazana indirgenmesi

Ekimi yapılacak hücrelerinden 100'er µl (10.000 cell/ml) 96 kuyucuklu plakalara eklendi ve 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi tamalandığında kuyucuklardaki mevcut besi yerleri uzaklaştırıldı, 50 µl PBS tamponu ile kuyucuklar yıkandı ve bu tampon tekrar uzaklaştırıldı. Akabinde, bu hücrelerin üzerine 50'şer µl taze tam besi yeri konuldu. Üzerlerine 50'şer µl farklı dozlarda (100-5000 µg/ml) örnekler ilave edildi. Kontrol kuyucuklarına ise 100 µl, % 0.2 DMSO içeren tam besiyeri konuldu. Plakalar 48 saat inkübasyon için tekrar 37 °C' de % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren inkübatör içerisine konuldu. İnkübasyon sonrası plakalar elisa okuyucuda 450 nm'de kolorimetrik olarak okundu. XTT tahlillerinin 96 kuyucuklu plakada gösterimi Şekil 3.4' de gösterilmektedir.

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

Şekil 3.4. *G. sphaerocephala* ekstrelerinin XTT analizinin 96 kuyucuklu plaka gösterimi

A1-A12, H1-H12, A1-H1 ve A12-H12 kuyucukları boş bırakıldı, B2-B11 ve C2-C11 arasındaki kuyucuklar hücrelidir. D2-D11 ve G2-G11 arasındaki kuyucuklar hücrelidir. B2-C2 kuyucukları kontrol grubu hücrelerini oluşturmaktadır. Bu kuyucuklara 50 µl besiyeri ve % 0.1 DMSO içeren besiyeri eklendi. B3-B11 arasındaki kuyucuklara ise 50 µl besiyeri ve üzerlerine 50 µl hazırlanan bitki ekstraktlarından artan konsantrasyonlarda (0.1-5 mg/ml) eklendi.

İnkübasyon süresi tamamlandığında plakalar içerisindeki herbir kuyucuğa 50'şer µl XTT kiti (5 ml XTT kitinin üzerine 100 µl aktivatöründen eklenerek hazırlandı) konuldu ve 5 saat inkübasyon olması için CO₂ inkübatöründe bekletildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, plakalar eliza okuyucu ile 450 nm'de okundu. Kuyucuklardaki mevcut hücre canlılığı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

Elde edilen sonuçlara göre, bitki ekstraktlarının ve standart ajanın IC₅₀ değerleri hesaplandı. (IC₅₀ değeri, hücre canlılığını % 50 azaltmak için gereken numune konsantrasyonudur)

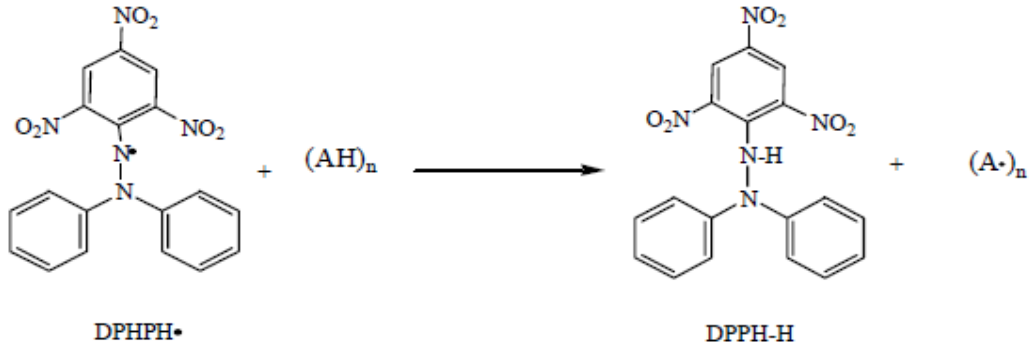
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Antioksidan Aktivite Araştırma Bulguları

4.1.1. DPPH• radikal giderme aktivitesi bulguları

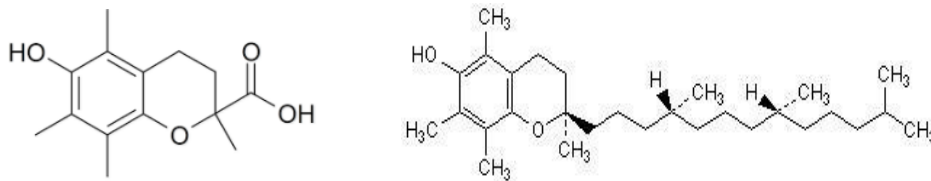
Kararlı serbest radikal olan DPPH'in antioksidan varlığında, süpürülmesi ile karakteristik mor renk açılmaktadır ve bu da spektrofotometrik ölçülebilmektedir (Archana vd., 2005). Bitki ekstraktları veya diğer antioksidan kaynaklar tarafından DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi ne kadar açılırsa, antioksidan kaynağın serbest radikali giderme gücü de o kadar yüksektir (Mathew ve Abraham, 2006).

DPPH• radikalinin antioksidan kaynak tarafından söndürülmesi Şekil 4.1' de gösterilmiştir.

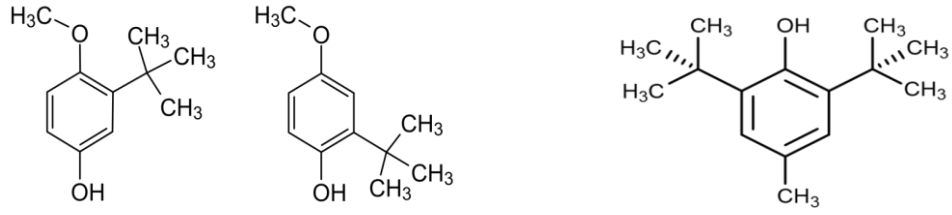


Şekil 4.1. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi (Köksal, 2007)

G. sphaerocephala türünün metanol ve su ekstraktlarının DPPH• serbest radikali giderme aktivitelerinin tespiti için yapılan çalışmada BHA, BHT, troloks ve α-tokoferol, standart antioksidan olarak kullanıldı Şekil (4.2 ve 4.3).

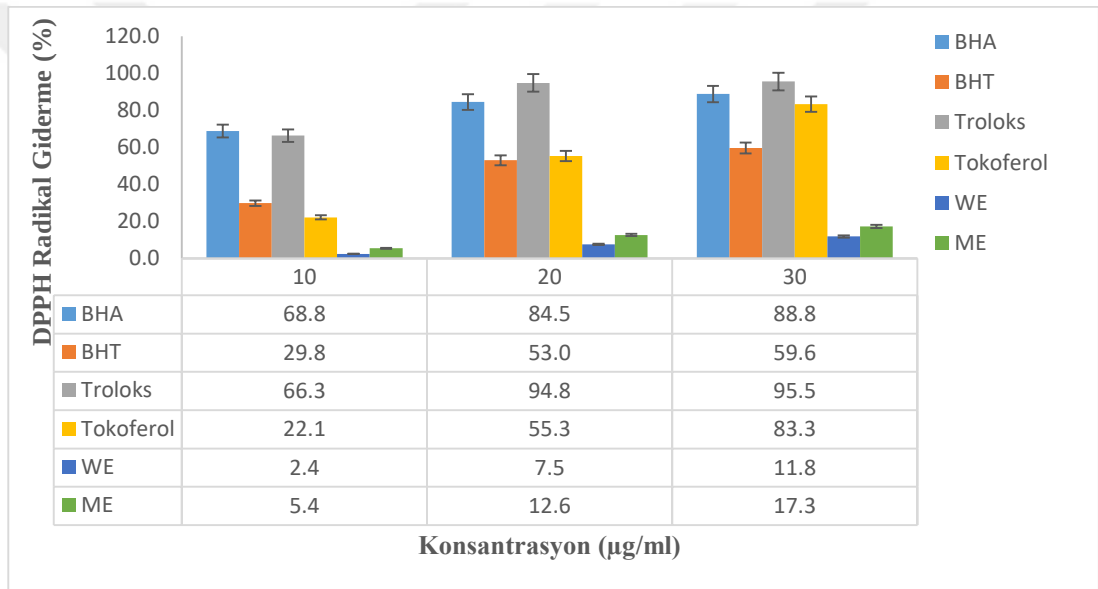


Şekil 4.2. Troloks ve Tokoferol'ün açık yapıları



Şekil 4.3. BHA ve BHT'nin açık yapıları

Ekstrelerin ve standart antioksidanların % DPPH gidermeleri Şekil 4.4’de grafiksel olarak verilmiştir. Ayrıca ekstrelerin ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstrelerinin DPPH radikal giderme aktiviteleri

Tablo 4.1. *G.sphaerocephala* türünün metanol ve su ekstraktlarının ve standart antioksidan bileşiklerinin DPPH radikal giderme kapasiteleri (SD*)

Örnekler	DPPH Radikal Giderme IC ₅₀ (µg/ml)
ME	655.3± 2.55 ^a
SE	876.2±3.2 ^b
^y BHA	8.2±0.52 ^c
^z BHT	21.6±1.02 ^d
Trolox	18.8±0.75 ^d
α-Tokoferol	28.4±0.45 ^e

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir (p <0.05)

^yBHA, Bütillenmiş hidroksi anisol

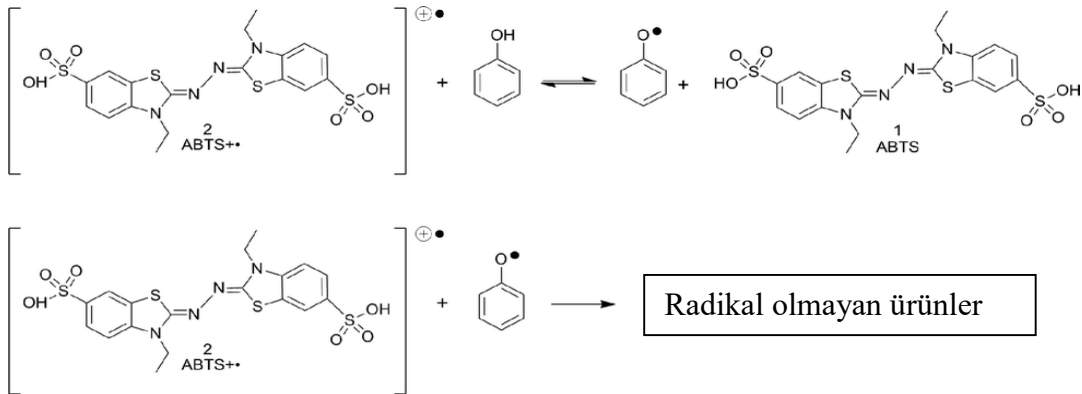
^zBHT, Bütillenmiş hidroksi toluen

ME, Metanol ekstresi

SE, Su ekstresi

4.1.2. ABTS⁺ radikal giderme aktivitesi bulguları

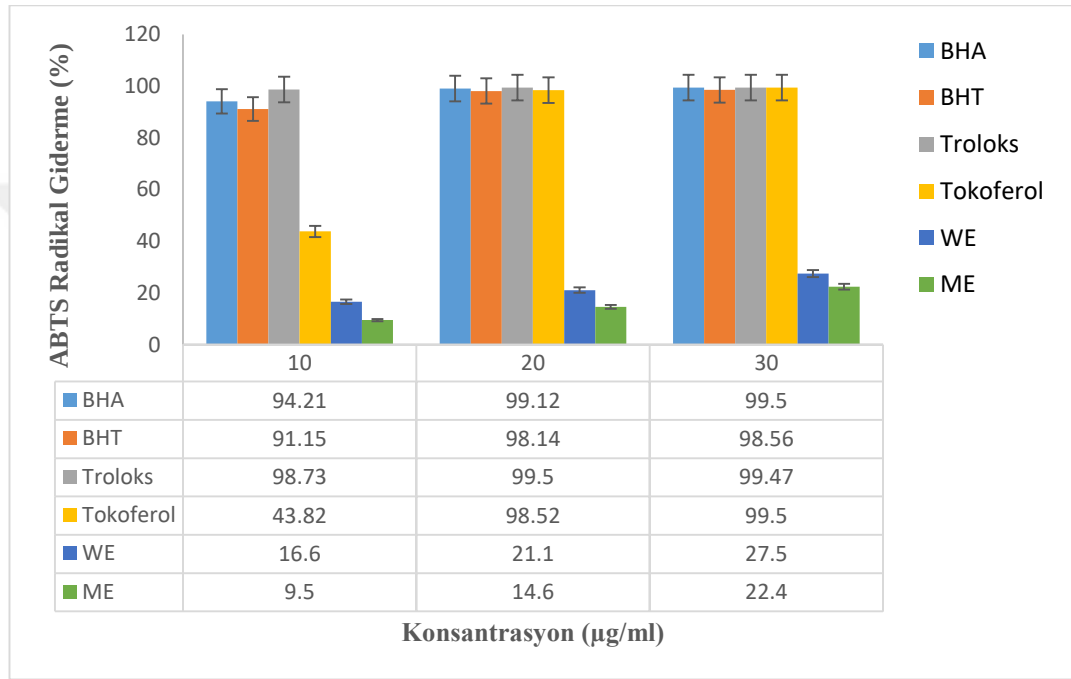
ABTS⁺ katyon radikal giderme yöntemi, ABTS⁺ çözeltisinin koyu yeşil renginin ortamdaki mevcut antioksidanlar tarafından elektron transferi ile renginin açılmasına ve bunun sonucunda meydana gelen absorbans değerindeki şiddet değişikliğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. ABTS⁺ çözeltisinin rengi antioksidan kaynağı tarafından ne kadar açılırsa test edilen bitki ekstresi veya diğer antioksidan kaynaklar o derece serbest radikal giderme gücüne sahip demektir. ABTS⁺ katyon radikalının antioksidan kaynak tarafından söndürülmesi Şekil 4.5’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Bir antioksidan tarafından ABTS radikalının giderilmesi (Eshtaya vd., 2016)

Bu çalışmada, *G. Sphaerocephala* türünün metanol ve su ekstralarının ABTS⁺ katyon radikalini giderme aktivitesini tespiti için yapılan çalışmada trolox, α -tokoferol, BHA ve BHT standart olarak kullanıldı.

Ekstrelerin ve standart antioksidanların % ABTS⁺ gidermeleri Şekil 4.6' da grafiksel olarak verilmiştir. Ayrıca ekstraların ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri Tablo 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstralarının ABTS radikal giderme aktiviteleri

Tablo 4.2. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstraktları'nın ve standart antioksidan bileşiklerin ABTS radikal giderme kapasiteleri (SD*)

Örnekler	ABTS ⁺ Radikal Giderme IC ₅₀ (µg/ml)
ME	154.6±2.92 ^a
SE	99.6±1.88 ^b
^a BHA	15.6±0.85 ^c
^b BHT	7.2±0.56 ^d
Trolox	12.4±0.56 ^e
α-Tokoferol	18.7±0.78 ^c

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir (p < 0.05)

^yBHA, Bütillenmiş hidroksi anisol

^zBHT, Bütillenmiş hidroksi toluen

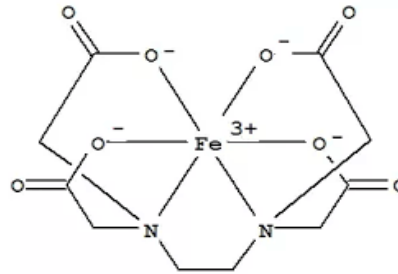
ME, Metanol ekstresi

SE, Su ekstresi

4.1.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları

Metal şelatlama metodu Fe²⁺ iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlama kapasitesine sahip ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan diğer metal bağlayıcı antioksidan bileşiklerinin yarışması esasına dayanmaktadır. Antioksidan kaynağının şelatlama gücü ne kadar yüksekse kırmızı renkli Fe²⁺/ferrozin kompleksinin oluşumu o derece engellenir.

Fe²⁺ iyonunun EDTA tarafından şelatlanması Şekil 4.7.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Metal iyonunun EDTA tarafından şelatlanması

Bu çalışmada, *G. Sphaerocephala* türünün metanol ve su ekstralarının metal şelatlama kapasitelerinin tespiti için yapılan çalışmada güçlü bir şelatlama kapasitesine sahip EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) standart olarak kullanıldı. Ekstrelerin ve EDTA'nın Fe^{2+} iyonunu şelatlama kapasite değerleri IC_{50} olarak Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstralarının ve EDTA'nın metal şelatlama kapasiteleri (SD*)

<i>G. sphaerocephala</i>	Fe^{2+} Şelatlama IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
ME	673.4 $\pm$ 3.48 ^a
SE	968.4 $\pm$ 3.52 ^b
EDTA	3.47 $\pm$ 0.27 ^c

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).

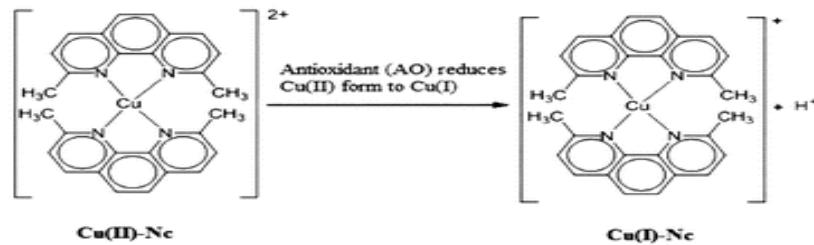
ME, Metanol ekstresi,

WE, Su ekstresi.

EDTA, Etilen diamin tetra asetik asit

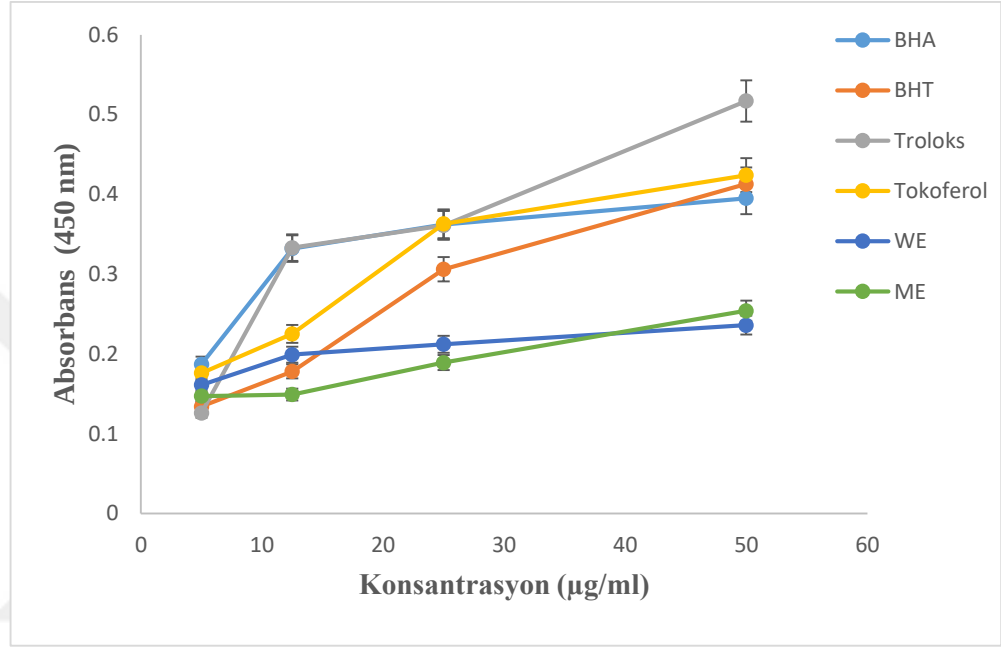
4.1.4. Bakır indirgeme (Cu^{2+} - Cu^+) kapasitesi tayini (Kuprak metodu) bulguları

Kuprak metodu antioksidan kaynaklar tarafından Cu^{2+} nin Cu^+ e indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Bu metoda göre kromojenik ayıraç olan bathocuproin (2,9- dimetil-4,7-difenil-1,10-phenanthrolin), Cu^+ ile bir kompleks oluşturur ve oluşan bu kompleks 490 nm'de maksimum absorbanı vermektedir. Absorbanstaki artış da bizlere uygulanan antioksidan kaynağın indirgeme gücünü göstermektedir. Antioksidan kaynaklar tarafından Cu^{2+} 'nin Cu^+ 'e indirgenmesi Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Antioksidan yapılar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi

G. sphaerocephala türünün metanol ve su ekstralarının (Cu^{2+}) indirgeme kapasitelerini belirlemek için bu ekstraların farklı konsantrasyonları hazırlandı (5-12.5-25-50 $\mu\text{g/ml}$) ve 450 nm'deki absorbansları kaydedildi. BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol, standart olarak kullanıldı. Örneklerin Cu^{2+} indirgeme kapasiteleri Şekil 4.9.'da grafiksel olarak verilmiştir.

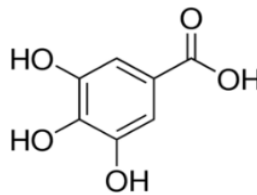


Şekil 4.9. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstralarının kuprik iyonlarını indirgeme kapasiteleri

4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı Araştırma Bulguları

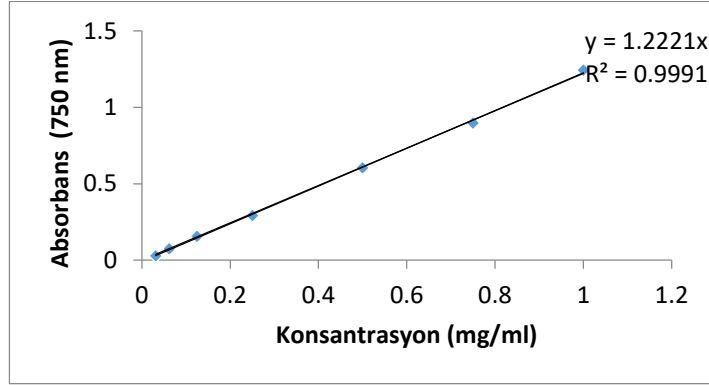
4.2.1. Toplam fenolik miktarı bulguları

G. sphaerocephala türünün metanol ve su ekstralarının toplam fenolik madde miktarı tayini için standart bir fenolik bileşik olan gallik asit kullanıldı. Gallik asitin yapısı Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Gallik asit'in kimyasal yapısı (Köksal, 2007)

Bunun için öncelikle gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiği çizildi. Gallik asit standart kalibrasyon eğrisi Şekil 4.11.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Gallik asit standart eğrisi

Elde edilen standart grafik yardımıyla bitkinin su ve metanol ekstralarının toplam fenolik bileşik miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstralarının toplam fenolik madde içerikleri (SD*)

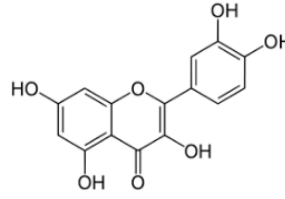
<i>G. sphaerocephala</i>	Fenolik madde miktarı (mg GAE/g ekstre)
ME	135.4±1.2 ^a
SE	111.6±1.7 ^b

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a, b, c, d ve e) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir (p <0.05).

ME, Metanol ekstresi,
SE, Su ekstresi.

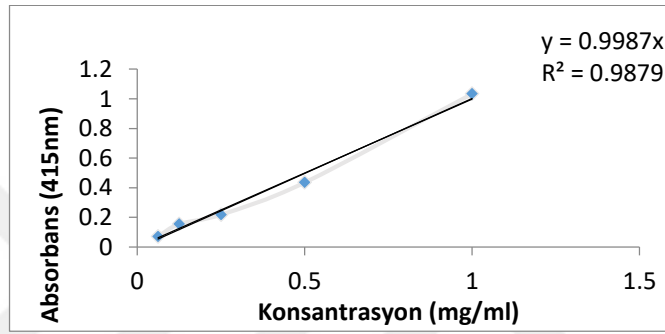
4.2.2. Toplam flavonoid miktarı bulguları

G. sphaerocephala türünün metanol ve su ekstralarının toplam flavonoid bileşik miktarı tayini için standart bir fenolik bileşik olan kuersetin kullanılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kuersetin'in açık yapısı (Köksal, 2007)

Bunun için öncelikle kuersetin'in farklı konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiği çizildi. Kuersetin'in kalibrasyon eğrisi Şekil 4.13.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Kuersetin standart eğrisi

Elde edilen kuersetin standart grafik yardımıyla bitkinin su ve metanol ekstratlarının toplam flavonoid miktarı kuersetin eşdeğer miktarı (QE) olarak ifade edildi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstratlarının toplam flavonoid madde içerikleri (SD*)

<i>G. sphaerocephala</i>	Flavonoid madde miktarı (mg QE/g ekstre)
ME	68.8±1.4 ^a
SE	37.7±0.9 ^b

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a ve b) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir (p < 0.05).

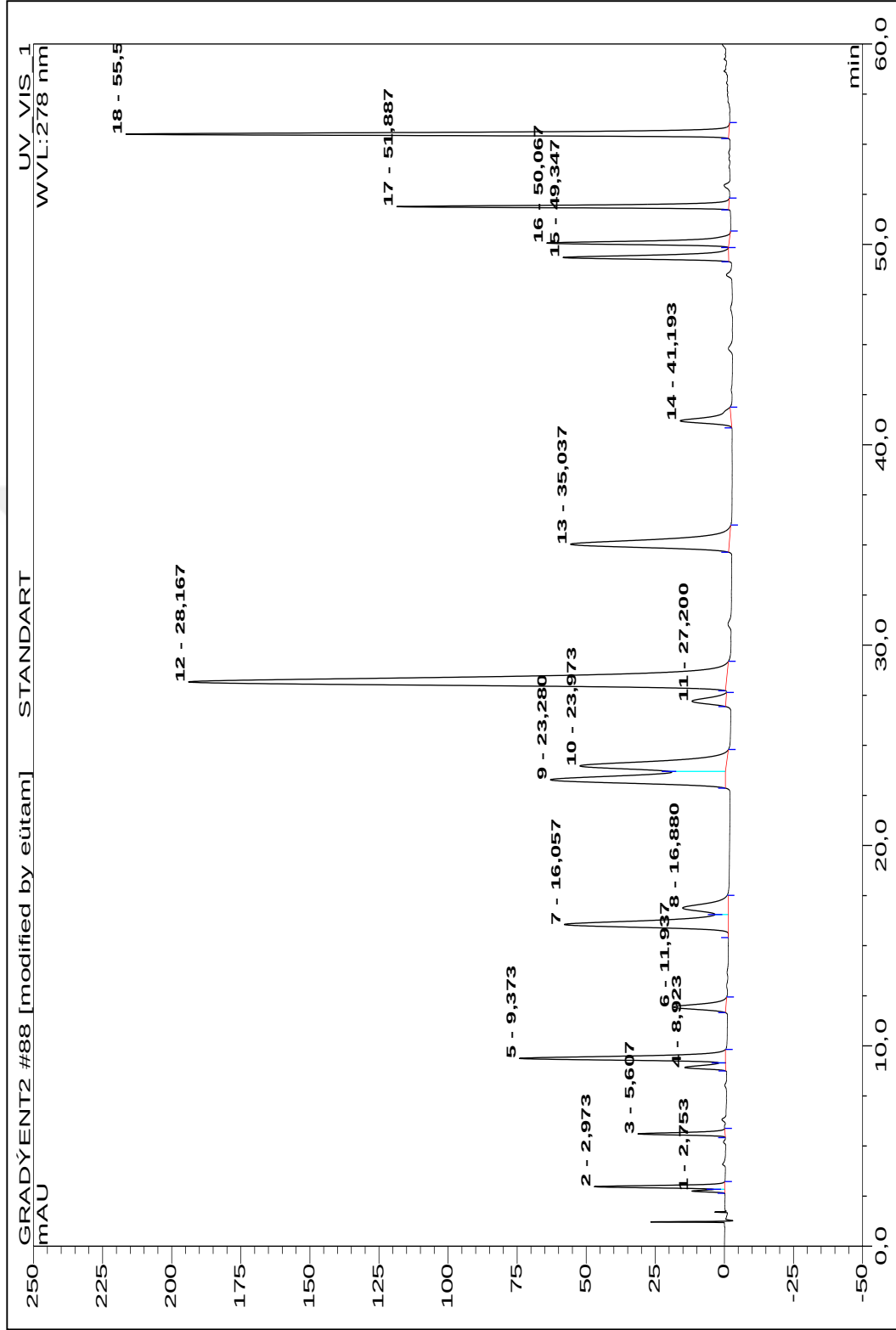
ME, Metanol ekstresi,
SE, Su ekstresi.

4.3. *G. sphaerocephala* Türünün HPLC Analiz Bulguları

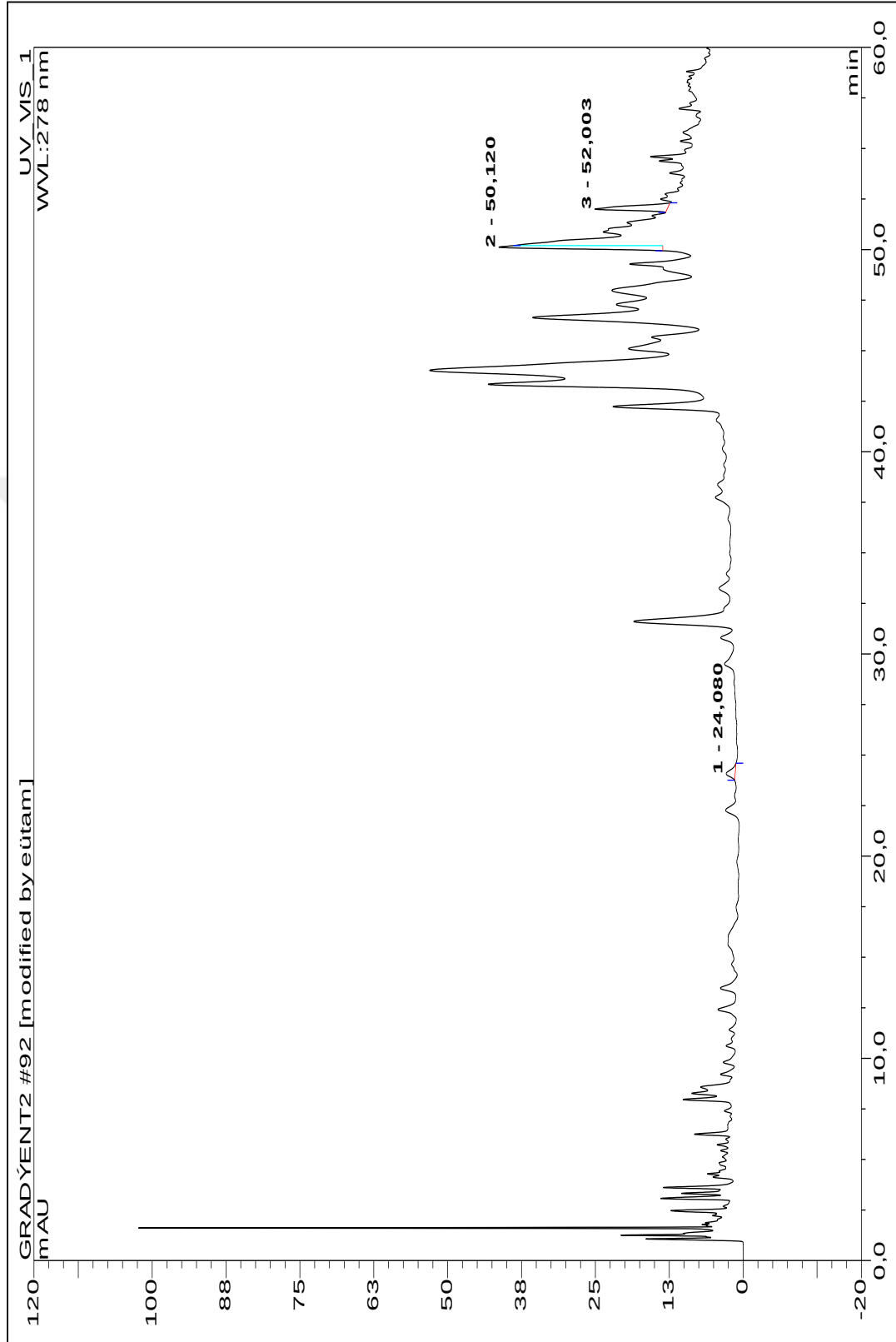
HLPC analizinde ilk olarak kalitatif tayin yapmak için Pirogallol (1), Gallik asit (2), 3,4-Dihidroksibenzoik asit (3), 2,3-Dihidroksibenzoik asit (4), Hidroksibenzoik asit (5), Kateşin (6), Kafeik asit (7), Klorajenik asit (8), Vanilin (9), Sirinjik asit (10), Epikateşin (11), p-Kumarik asit (12), Taksifolin,(13), Sinapik asit (14), Resveratrol (15), Rutin (16),

Rosmarinik asit (17), Naringenin (18) standartlarından oluşan bir kromatogram oluşturuldu (Şekil 4.16). Daha sonra *G. sphaerocephala* türünün metanol ve su ekstraktları 10 mg/mL'lik konsantrasyonlar ile oluşturulan uygulamada analiz edildi. Su ve metanol ekstraktlarının HPLC kromatogramları Şekil 4.14-4.16.' da gösterilmiştir.

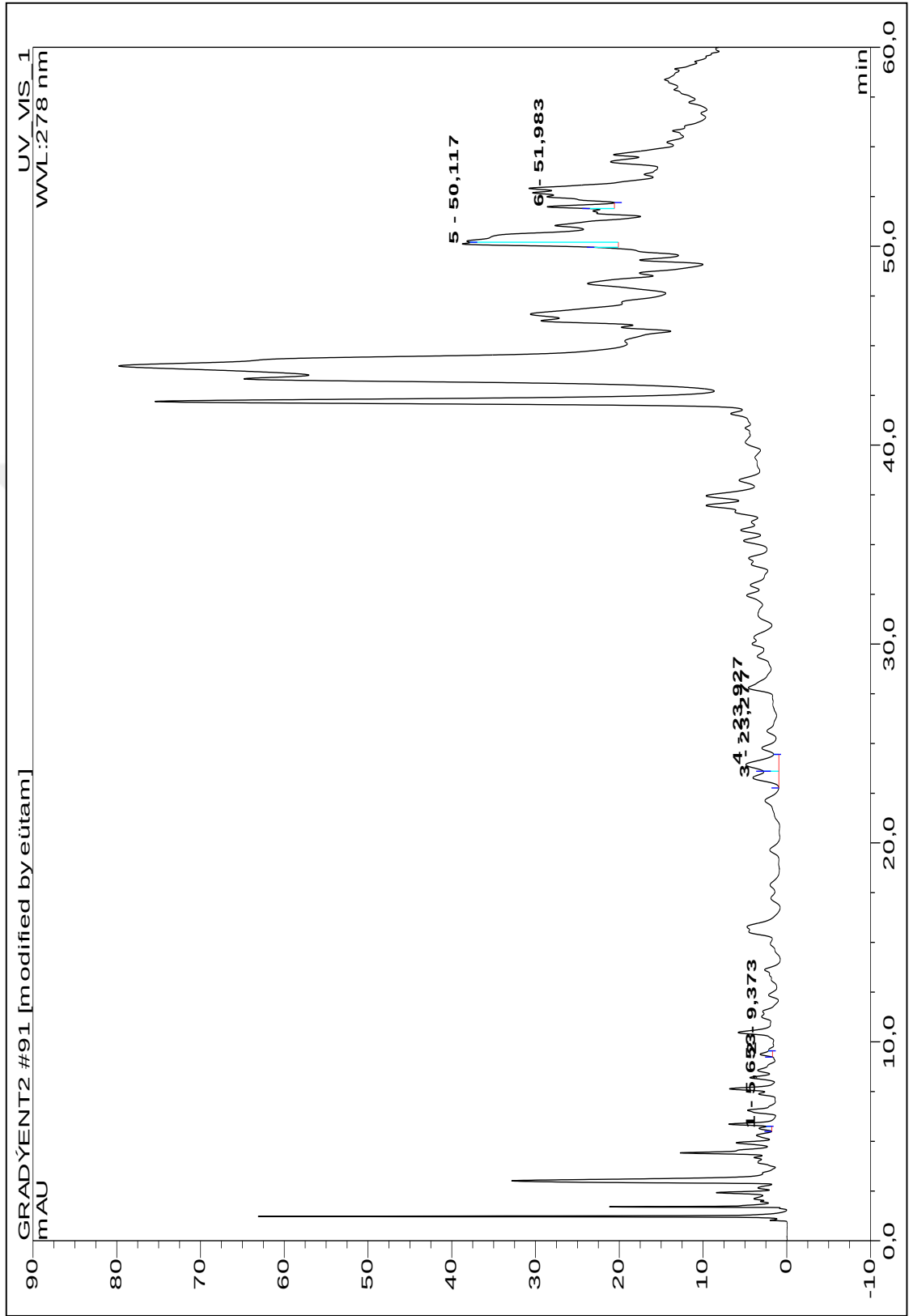




Şekil 4.14. Standart fenolik bileşiklerin HPLC kromatogramı



Şekil 4.15. *G. sphaerocephala* türünün su ekstresinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.16. *G. sphaerocephala* türünün metanol ekstresinin HPLC kromatogramı

Elde edilen veriler neticesinde ekstrelerin HPLC kromatogramları standart fenolik bileşiklere ait kromatogram ile kıyaslandı ve aynı alıkonma süresine sahip piklerin UV spektrumları karşılaştırılarak ekstrelerin fenolik içerikleri tespit edildi. Analiz sonuçları analitik parametrelerle birlikte analiz sonuçları Tablo 4.6.' da verilmiştir.

Tablo 4.6. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstrelerinin HPLC analiz sonuçları (SD*)

No	Fenolik standart	ME	SE	Analitik parametreler			
		(Konsantrasyon (µg/100g ekstre))		RT	LOD	LOQ	R ²
1	3,4-Dihidroksibenzoik asit	41.8 ± 0.43	ND	5.6	0.0003	0.001	0.999
2	p-Hidroksibenzoik asit	19.8 ± 0.43	ND	9.37	0.003	0.001	0.999
3	Vanilin	15.1 ± 0.22	ND	23.28	0.002	0.008	0.995
4	Sirinjik asit	20.3 ± 0.15 ^a	5.8 ± 0.02 ^b	23.97	0.002	0.009	0.996
5	Rutin	32.1 ± 0.34 ^a	43.8 ± 0.51 ^b	50.07	0.002	0.005	0.997
6	Rosmarinik asit	19.5 ± 0.18 ^a	35.1 ± 0.31 ^b	51.89	0.002	0.005	0.998

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a ve b) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir (p < 0.05).

LOD: 3*Gürültü/Eğim

LOQ: 10*Gürültü/Eğim

RT: Alıkonma süresi

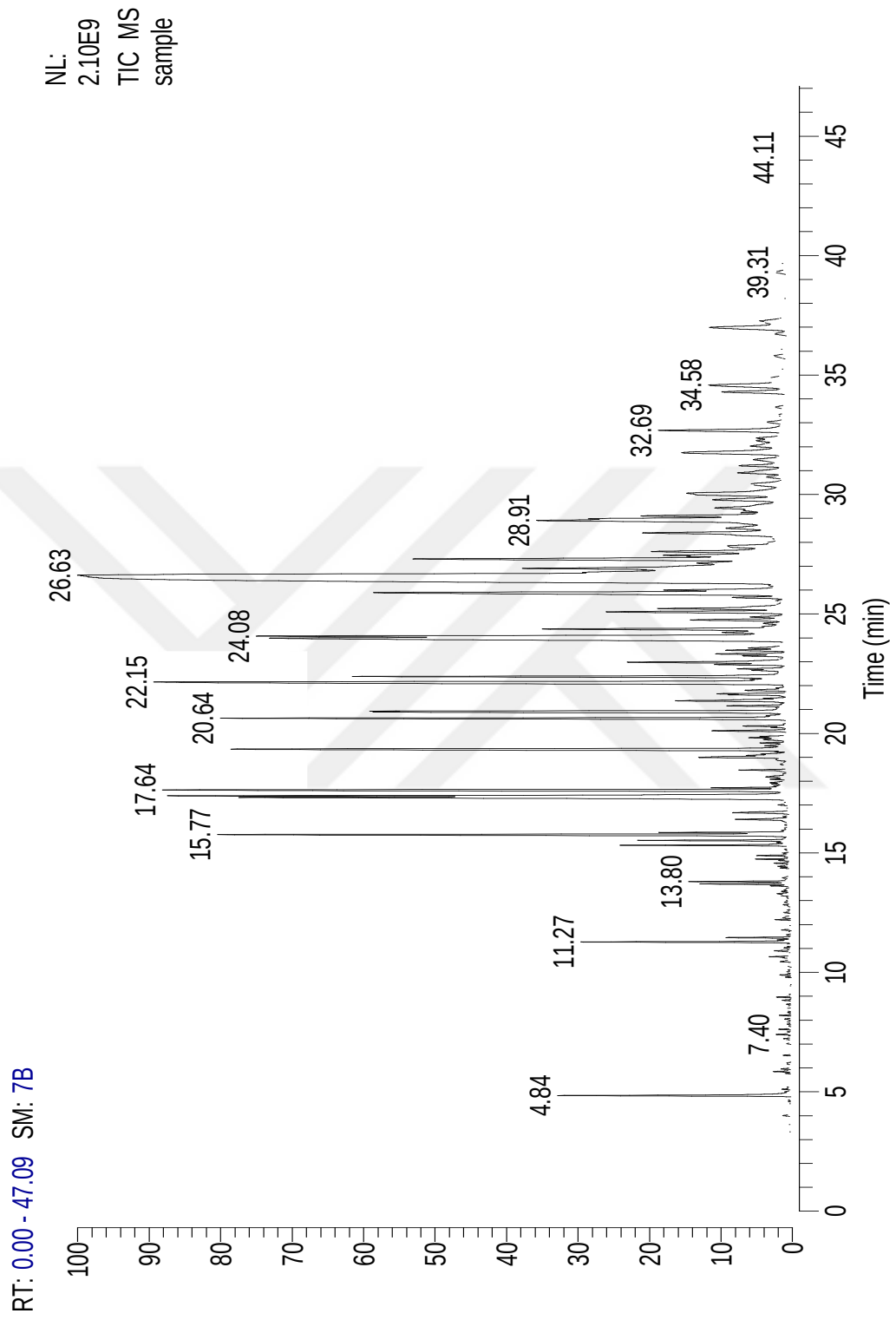
ND: Dedeksiyon yok

ME: Metanol ekstresi

SE: Su ekstresi

4.4. *G. sphaerocephala* Türünün GC-MS Analiz Bulguları

G. sphaerocephala türünün hekzan ekstresinden elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.17. 'de sunulmaktadır. Analizler sonucunda bitki içeriğinde bazıları eser miktarda bazıları ise yüksek miktarda olmak üzere toplamda 131 tane bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin isimleri, alıkonma süreler, % bolluk oranları ve kütüphane bilgileri Tablo 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.17. *G. sphaerocephala* türünün GC-MS kromatogramı

Tablo 4.7. *G. sphaerocephala* türünün esansiyel yağ profili

Pik No	Bileşik Adı	RT	% Bolluk	Kütüphane
1	Hexanoic acid methyl ester	3.34	0.01	Wiley 9
2	Undecane,4,8-dimethyl-(CAS)	8.66	0.02	Wiley 9
3	Dodecane,2,7,10-trimethyl	8.83	0.04	Wiley 9
4	Decanoic acid, methyl ester (CAS)	8.96	0.05	Wiley 9
5	Tetradecane,2,6,10 trimethyl-(CAS)	9.07	0.01	Wiley 9
6	Tetradecane,2,6,10-trimethyl-(CAS)	9.42	0.01	Wiley 9
7	1-Pentadecene (CAS)	9.80	0.02	Wiley 9
8	Tetradecane (CAS)	9.89	0.04	Wiley 9
9	pentadecane	10.01	0.04	Wiley 9
10	Dodecanal (CAS)	10.09	0.02	Wiley 9
11	Nonanoicacid,9-oxo-, methyl ester (CAS)	10.45	10.45	Wiley 9
12	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester (CAS)	10.65	0.12	Wiley 9
13	Heptacosane	10.90	0.08	Wiley 9
14	Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl- (CAS)	11.02	0.02	Wiley 9
15	Eicosane (CAS)	11.10	0.01	Wiley 9
16	dimethylbenzene-1,3-dicarboxylate	11.27	0.85	Wiley 9
17	Cyclopropanenonanoic acid, methyl ester (CAS)	11.36	0.04	Wiley 9
18	Dodecanoicacid,methyl ester (CAS)	11.46	0.22	Wiley 9
19	Tetradecane,2,6,10-trimethyl-(CAS)	11.57	0.02	Wiley 9
20	Tetradecane,2,6,10-trimethyl-(CAS)	11.69	0.01	Wiley 9
21	Nonanedioic acid, dimethyl ester (CAS)	11.77	0.03	Wiley 9
22	Tetradecane,2,6,10trimethyl(CAS)	11.84	0.01	Wiley 9
23	Tetradecane,2,6,10-trimethyl-(CAS)	11.94	0.01	Wiley 9
24	2-Hexadecenoic acid, methyl ester, (E)- (CAS)	12.05	0.01	Wiley 9

Tablo 4.7. (devam)

25	1-Hexadecene (CAS)	12.20	0.05	Wiley 9
26	Nonadecane (CAS)	12.28	0.06	Wiley 9
27	Tetradecanal (CAS)	12.50	0.03	Wiley 9
28	Tridecanoic acid, methyl ester (CAS)	12.60	0.01	Wiley 9
29	Eicosane (CAS)	12.77	0.01	Wiley 9
30	Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl- (CAS)	13.00	0.01	Wiley 9
31	Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl- (CAS)	13.29	0.05	Wiley 9
32	Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl- (CAS)	13.38	0.02	Wiley 9
33	Tetradecane,2,6,10-trimethyl- (CAS)	13.44	0.02	Wiley 9
34	Tetradecane,2,6,10-trimethyl- (CAS)	13.51	0.01	Wiley 9
35	Tetradecanal (CAS)	13.62	0.06	Wiley 9
36	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)	13.70	0.31	Wiley 9
37	Dodecanoic acid, 11-hydroxy-, methyl ester	13.80	0.37	Wiley 9
38	Tetradecane,2,6,10-trimethyl- (CAS)	14.08	0.01	Wiley 9
39	Tetradecane,2,6,10-trimethyl- (CAS)	14.20	0.00	Wiley 9
40	2,2-Dideutero Octadecanal	14.29	0.01	Wiley 9
41	1-Eicosanol (CAS)	14.37	0.03	Wiley 9
42	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	14.57	0.06	Wiley 9
43	Pentadecanoic acid, methyl ester (CAS)	14.74	0.15	Wiley 9
44	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl- (CAS)	14.89	0.13	Wiley 9
45	Tetradecane,2,6,10-trimethyl- (CAS)	15.13	0.02	Wiley 9
46	Hexadecen-1-ol, trans-9-	15.32	0.65	Wiley 9
47	Tetratriacontane (CAS)	15.43	0.02	Wiley 9
48	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS)	15.52	0.59	Wiley 9

Tablo 4.7. (devam)

49	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	15.76	3.26	Wiley 9
50	Dodecanoic acid, methyl ester (CAS)	15.85	0.49	Wiley 9
51	Tetratriacontane (CAS)	15.94	0.01	Wiley 9
52	Tetratriacontane (CAS)	16.03	0.01	Wiley 9
53	Hexadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester (CAS)	16.40	0.30	Wiley 9
54	1-Hexadecanol, 2-methyl- (CAS)	16.52	0.02	Wiley 9
55	Heptadecanoic acid, methyl ester (CAS)	16.68	0.35	Wiley 9
56	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	17.01	0.03	Wiley 9
57	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS)	17.32	3.26	Wiley 9
58	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	17.39	3.12	Wiley 9
59	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	17.63	3.99	Wiley 9
60	Methyl15-Acetylhydroxypalmitate	17.73	0.23	Wiley 9
61	Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS)	17.89	0.03	Wiley 9
62	9-Octadecenoic Acid (Z)-, Ethyl Ester	17.94	0.06	Wiley 9
63	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	18.08	0.05	Wiley 9
64	Tetradecane,2,6,10-trimethyl- (CAS)	18.18	0.13	Wiley 9
65	2,2-Dideutero Octadecanal	18.30	0.01	Wiley 9
66	Docosane, 11-decyl- (CAS)	18.71	0.05	Wiley 9
67	Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS)	18.87	0.04	Wiley 9
68	1-Heneicosyl formate	18.99	0.74	Wiley 9
69	Eicosanoic Acid, Methyl Ester	19.34	3.86	Wiley 9
70	1,3,5-Triazine-2,4-diamine, 6-chloro-N-ethyl- (CAS)	19.48	0.06	Wiley 9

Tablo 4.7. (devam)

71	Docosane, 11-decyl- (CAS)	19.60	0.08	Wiley 9
72	Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS)	19.75	0.13	Wiley 9
73	Heneicosanoic acid, methyl ester (CAS)	20.11	0.41	Wiley 9
74	Docosane, 11-decyl- (CAS)	20.31	0.23	Wiley 9
75	Tetrapentacontane, 1,54- dibromo-	20.39	0.01	Wiley 9
76	Hexatriacontane (CAS)	20.63	3.19	Wiley 9
77	Docosanoic Acid, Methyl Ester	20.90	3.40	Wiley 9
78	Tetratriacontane (CAS)	21.07	0.01	Wiley 9
79	Heneicosane,11-(1- ethylpropyl)- (CAS)	21.15	0.25	Wiley 9
80	Hexatriacontane (CAS)	21.36	0.73	Wiley 9
81	1-Dotriacontanol (CAS)	21.47	0.07	Wiley 9
82	Hexadecanal (CAS)	21.66	0.51	Wiley 9
83	Tetracosane, 11-decyl- (CAS)	21.80	0.25	Wiley 9
84	1-Hexadecanol,2- methyl- (CAS)	21.90	0.04	Wiley 9
85	1-Heneicosyl formate	22.15	5.65	Wiley 9
86	Oxirane, [(hexadecyloxy)methyl]-	22.26	0.02	Wiley 9
87	Tetracosanoic acid, methyl ester (CAS)	22.38	2.37	Wiley 9
88	Eicosane, 2-methyl- (CAS)	22.64	0.13	Wiley 9
89	Heneicosane,11- cyclopentyl- (CAS)	22.70	0.20	Wiley 9
90	Tetratriacontane (CAS)	22.89	0.36	Wiley 9
91	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	22.98	1.04	Wiley 9
92	Heneicosanoic acid, methyl ester (CAS)	23.25	0.20	Wiley 9
93	Hexadecanal (CAS)	23.33	0.36	Wiley 9

Tablo 4.7. (devam)

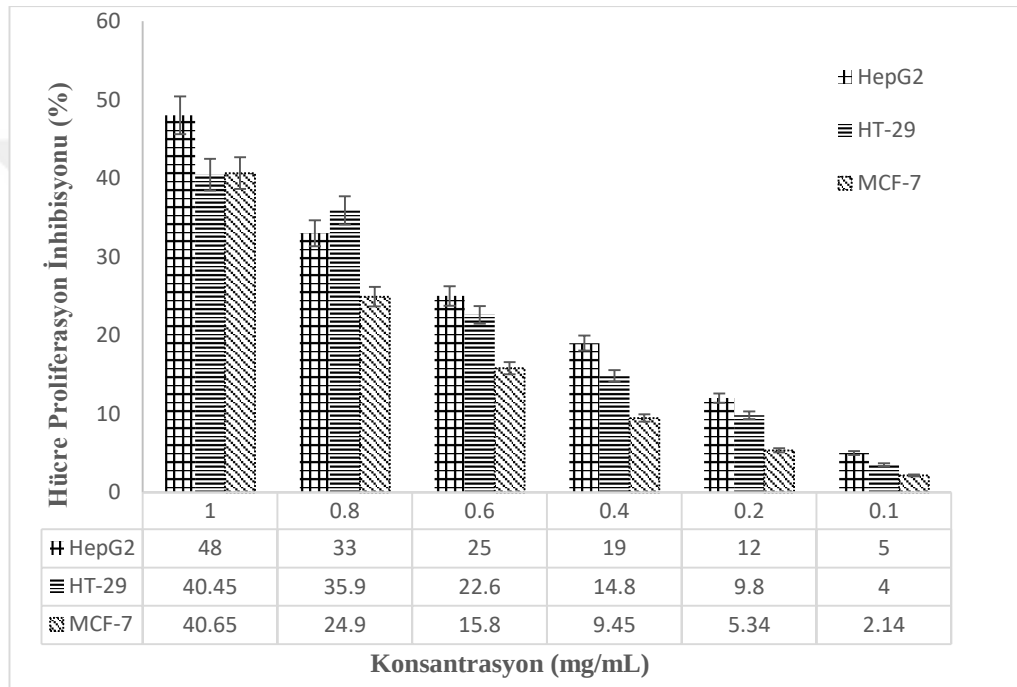
94	Docosane, 11-decyl- (CAS)	23.48	0.34	Wiley 9
95	1-Dotriacontanol (CAS)	23.57	0.21	Wiley 9
96	Tetratriacontane (CAS)	23.99	5.06	Wiley 9
97	1-Pentacosanol	24.08	3.11	Wiley 9
98	Pentatriacontane (CAS)	24.22	0.16	Wiley 9
99	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	24.37	1.37	Wiley 9
100	Heptacosane (CAS)	24.61	0.09	Wiley 9
101	Eicosane, 2-methyl- (CAS)	24.75	0.61	Wiley 9
102	Cyclodocosane, Ethyl-Ester	24.87	0.21	Wiley 9
103	Heptacosane	25.09	1.20	Wiley 9
104	Heptacosanoic Acid, Methyl Ester	25.23	0.83	Wiley 9
105	Heptacosanoic acid, Methyl Ester	25.55	0.04	Wiley 9
106	Octadecanal (CAS)	25.69	0.26	Wiley 9
107	Docosane, 11-decyl- (CAS)	25.89	3.31	Wiley 9
108	1-Hentetracontanol (CAS)	26.01	0.33	Wiley 9
109	Hentriacontane	26.51	16.87	Wiley 9
110	Pentatriacontane (CAS)	26.76	0.10	Wiley 9
111	Tetracosanoic acid, methyl ester (CAS)	26.91	1.15	Wiley 9
112	Heptacosane (CAS)	27.13	0.16	Wiley 9
113	Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl)- (CAS)	27.30	2.57	Wiley 9
114	1-Hexadecanol, 2-methyl- (CAS)	27.46	0.39	Wiley 9
115	Hentriacontane	27.61	0.69	Wiley 9
116	Dotriacontane (CAS)	28.16	0.01	Wiley 9
117	Docosane, 11-decyl- (CAS)	28.39	1.15	Wiley 9
118	1-Hexadecanol, 2-methyl- (CAS)	28.59	0.31	Wiley 9
119	Hentriacontane	28.91	2.28	Wiley 9
120	1-Hentetracontanol (CAS)	29.11	0.62	Wiley 9
121	2,2-Dideutero Octadecanal	29.24	0.03	Wiley 9
122	Stigmast-7-en-3-ol, (3 α ,5 α)-	29.78	0.57	Wiley 9

Tablo 4.7. (devam)

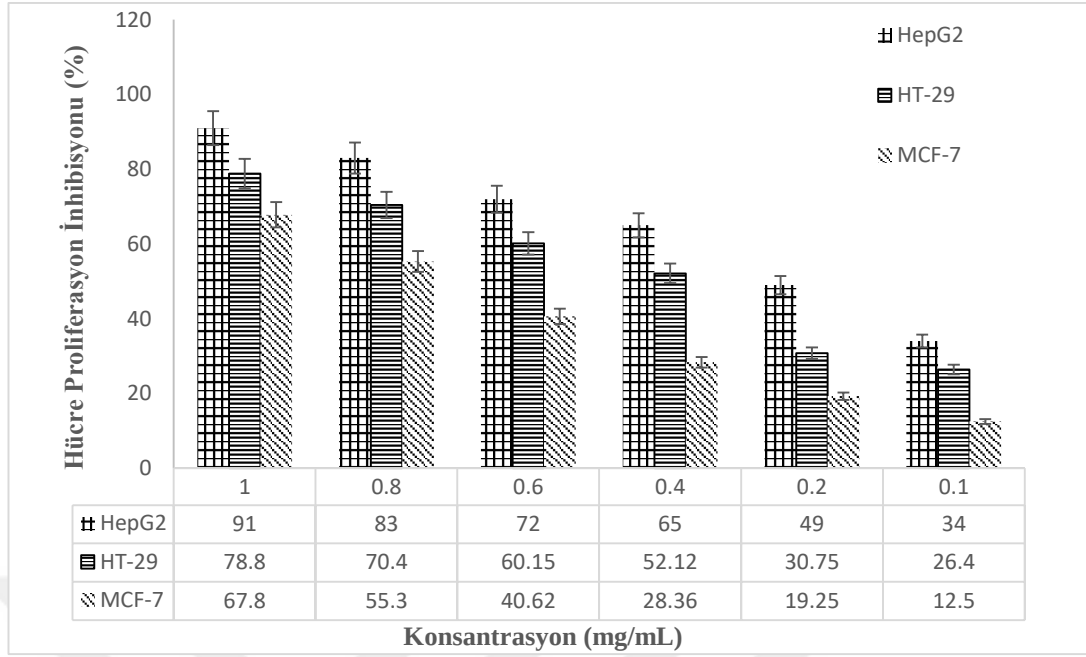
123	Dotriacontane (CAS)	30.73	0.12	Wiley 9
124	2,2-Dideutero Octadecanal	30.91	0.41	Wiley 9
125	1-Hexadecanol,2- methyl- (CAS)	31.21	0.30	Wiley 9
126	1-Heptacosanol (CAS)	31.75	0.96	Wiley 9
127	Tetratriacontane (CAS)	32.03	0.21	Wiley 9
128	Cyclodocosane, Ethyl-ester	32.68	0.97	Wiley 9
129	2-Hexadecanol (CAS)	33.03	0.13	Wiley 9
130	Dotriacontane (CAS)	33.31	0.05	Wiley 9
131	Dotriacontane (CAS)	33.49	0.01	Wiley 9

4.5. *G. sphaerocephala* Türünün Antiproliferatif Aktivite Araştırma Bulguları

G. sphaerocephala türünün su ve metanol ekstraktları'nın insan kolon (HT-29), meme (MCF-7) ve karaciğer (HepG2) kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT yöntemi ile araştırıldı. 48 saat inkübasyon sonrasında ekstraktların test edilen hücre hatları üzerindeki farklı konsantrasyonlarına karşı % hücre proliferasyon inhibisyonları Şekil 4.18 ve 4.19.'da verilmiştir. Ayrıca, ekstraktların ve pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU (5-Florourasil)'nin IC₅₀ değerleri Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. *G. sphaerocephala* türünün su ekstresinin HT-29, MCF-7 ve HepG2 kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.19. *G. sphaerocephala* türünün metanol ekstresinin HT-29, MCF-7 ve HepG2 kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesi

Tablo 4.8. *G. sphaerocephala* türünün su ve metanol ekstrelerinin HT-29, MCF-7 ve HepG2 kanser hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri

<i>G. sphaerocephala</i>	IC ₅₀ (mg/ml)		
	HT-29	MCF-7	HepG2
ME	0.46 ± 0.05 ^a	0.73 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.03 ^a
SE	1.19 ± 0.03 ^b	1.30 ± 0.06 ^b	1.12 ± 0.09 ^b
5-FU	0.023 ± 0.006 ^c	0.018 ± 0.004 ^c	0.047 ± 0.002 ^c

^x Aynı sütunda farklı üst-yazılarla (a, b ve c) işaretlenmiş olan verinin istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olduğunu göstermektedir (p < 0.05).

ME: Metanol ekstresi.

SE: Su ekstresi.

5-FU: 5-Fluorourasil.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1. Fenolik ve Flavonoid İçerik Sonuçları

Günümüzde bir çok bitki özütü ve çeşitli formülasyonlar türetilmiştir. Bunlar alternatif tıp olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitki ekstralarının çeşitli biyolojik etkileri olabileceği zengin fitokimyasal içeriklerine atfedilmiştir (Hosseinzadeh vd., 2015). Bu nedenle bitki özlerinin fitokimyasal içeriği biyolojik aktivite potansiyelleri arasında bir korelasyon kurmak çok önemlidir. Bu çalışmada *Gypsophila sphaerocephala* bitki ekstralarının fitokimyasal bileşimi hem nitel hem de nicel analizler yapılarak ilk kez incelendi. Kolorimetrik deneyler bitkinin toplam fenolik ve flavonoid içeriği bakımından oldukça zengin olduğunu gösterdi.

Bitkinin metanol ve su ekstralarının fenolik içerikleri sırasıyla 135.47 mg GAE/g eks. ve 111.64 mg GAE/g eks. olarak belirlendi. Flavonoid içerik sonuçları ise sırasıyla 68.81 mg QE/g ve 37.75 mg QE/g olarak bulundu. Bu sonuçlar metanol ekstrasının su ekstrasına göre fenolik ve flavonoid içerik bakımından daha zengin olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde *Gypsophila* bitkisinin üç farklı türü; *G. glomerata*, *G. trichotoma* and *G. perfoliata* ile yapılan çalışmada bu türlerin toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 20.59, 17.07 ve 21.60 mg GAE/g ekstre olarak belirlenmiştir (Zheleva-Dimitrova vd., 2018). Aynı bitkilerin toplam flavonoid içerikleri ise sırasıyla 33.00, 35.58 and 25.07 mg RE/g ekstre olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada *G. pilulifera*’nın toplam fenolik içeriği 6.5 mg GAE/g ekstre olduğu bildirilmiştir (Yazici ve Özmen, 2017). Başka bir çalışmada *G. arrosti* ve *G. simoni* bitkilerinin toplam fenolik içerikleri sırasıyla 0.26 ve 15.15 mg GAE/g ekstre olarak rapor edilmiştir (Arslan ve Çelik, 2013).

Literatür ile karşılaştırıldığında *Gypsophila sphaerocephala* türünün toplam fenolik madde içeriği açısından üstünlüğü görülmektedir.

Toplam fenolik ve flavonoide içeriğine paralel olarak *Gypsophila sphaerocephala* türünün metanol ve su ekstralarının bireysel fenolik madde içerikleri onsekiz standart fenolik madde üzerinden HPLC analizleri ile belirlenmeye çalışıldı.

Tablo 4.6’da görüldüğü üzere *Gypsophila sphaerocephala*’nın metanol ekstrasının fenolik madde içeriği sırasıyla 3,4-dihidroksibenzoik asit (41.8 µg/100 g eks.), rutin (32.1

µg/100 g eks.), sirinik asit (20.3 µg/ 100 g eks.), p-hidroksibenzoik asit (19.8 µg/ 100 g eks.), rosmarinik asit (19.5 µg/ 100 g eks.) ve vanilin (15.1 µg/ 100 g eks.) olarak belirlendi. Su ekstresinde en fazla bulunan fenolik bileşikler ise sırasıyla rutin (43.8 µg/ 100 g eks.), rosmarinik asit (35.1 µg/ 100 g eks.), ve sirinik asit (5.8 µg/ 100 g eks.) olarak belirlendi.

Literatürde yapılan bir çok çalışma göstermiştir ki *Gypsophila* türlerinde bulunan ana fenolik bileşik saponarindir (apigenin-6-C-glukozil-7-O-glukozit) (Vitcheva vd., 2011; Yazici ve Özmen, 2017; Arslan ve Çelik, 2013; Chima vd., 2014).

Bu çalışma, *Gypsophila sphaerocephala* türünün fenolik madde içeriğini HPLC analizleriyle onsekiz standart fenolik madde üzerinden kalitatif ve kantitatif olarak rapor eden ilk çalışmadır.

5.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada *G. sphaerocephala* türünün metanol ve su ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri DPPH ve ABTS radikallerini giderme aktiviteleri, Kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri (KUPRAK) ve Demir (II) iyonlarını şelatlama aktiviteleri üzerinden değerlendirildi. Antioksidan radikal süpürme etkilerini değerlendirmede DPPH ve ABTS radikalleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao vd., 2006). Bu nedenle *G. sphaerocephala* ekstraktlarının radikal giderme kapasiteleri iki farklı radikal test sistemi (DPPH ve ABTS) kullanılarak incelenmiştir. Tablo 4.1'den görüldüğü üzere, *G. sphaerocephala*'nın metanol ekstresinin DPPH radikal süpürme aktivitesinin (IC_{50} : 655.3 µg/mL) su ekstresinin aktivitesinden (IC_{50} : 876.2 µg/mL) daha yüksektir.

ABTS radikal süpürme aktivitesinde ise su ekstresinin (IC_{50} : 99.6 µg/mL) metanol ekstresinden (IC_{50} : 154.6 µg/mL) daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 4.2). Bu bulgular literatürle de yakından ilgilidir. Serteser ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada beş farklı *Gypsophila* türünün DPPH radikal süpürme aktivitelerinin IC_{50} değerleri 3.1 ile 3.6 mg/mL arasında değiştiği rapor edilmiştir (Serteser vd., 2009). Başka bir çalışmada farklı *Gypsophila pilulifera* ekstraktlarının DPPH radikal süpürme aktivitelerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 0.446 mg/mL ve 4.56 mg/mL olarak rapor edildi (Yazici ve Özmen, 2017; Chima vd., 2014).

Metadoloji, solvent polaritesindeki farklılık ve deney koşulları antioksidan aktivite sonuçlarını muhakkak etkilemektedir (Tohidi vd., 2017). Ayrıca bitki özlerindeki vitaminler, flavonoidler, fenolik asitler ve kükürt bileşiklerin varlığı antioksidan aktiviteyi etkiler (Embuscado, 2015; Skrovankova vd., 2015).

Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikallerin üretilmesini sağlayıp lipid peroksidasyonunu hızlandırır, böylece lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonun devam etmesine yol açar. Bu nedenle bitki türlerinin antioksidan faaliyetlerinin değerlendirilmesinde metal şelatlama kapasite tayini önemli yer tutmaktadır.

Tablo 4.3' deki sonuçlara göre *Gypsophila sphaerocephala*'nın metanol ekstresinin metal şelatlama kapasitesi (IC_{50} : 149.2 $\mu\text{g/mL}$), su ekstresinin metal şelatlama kapasitesinden (IC_{50} 166.5 $\mu\text{g/mL}$) daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak her iki ekstrenin de metal şelatlama kapasitelerinin standart olarak kullanılan EDTA'nın altında olduğu gözükmemektedir.

Literatürde yer alan bir çalışmada beş farklı *Gypsophila* türünün Fe^{+2} şelatlama kapasiteleri değerlendirilmiş ve bu değerlerin %17.2 ile %24.3 arasında değiştiği bildirilmiştir (Serteser vd., 2009). Öte yandan, bu çalışmada *G. sphaerocephala*'nın metanol ve su ekstrelerinin sırasıyla % 51 ve % 63'e kadar Fe^{+2} iyonlarını şelatlama kapasitelerinin olduğu görüldü.

KUPRAK testi, az sayıda ekipmanın yanı sıra hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar nedeni ile antioksidan potansiyeli test etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tusevski vd., 2014).

G. sphaerocephala türünün özlerinin antioksidan potansiyelini incelemek için ekstrelerin Cu^{+2} 'yi Cu^{+} 'e indirgeme güçleri araştırıldı. Şekil 4.9'da gösterildiği gibi her iki ekstre de kayda değer Cu^{+2} iyonlarını indirgeme kapasitesi sergiledi. Hatta standart olarak kullanılan BHT ve trolox'dan daha yüksek bir aktivite sergiledikleri gözlemlendi. Konsantrasyon arttıkça, metanol ekstresinin su ekstresine kıyasla daha yüksek aktivite sergilediği belirlendi.

5.3. Esansiyel Yağ İçeriği Sonuçları

Gypsophila sphaerocephala bitkisinin hekzan ekstresi ile yapılan GC-MS analizleri sonucunda, bitkinin 9-Octadecenoic acid (Z)-methyl ester, Octadecanoic acid methyl ester, Heptacosane ve Hentriacontane esansiyel yağları açısından oldukça zengin olduğu saptanmıştır.

9-Octadecenoic acid (Z)-methyl ester, insan kanında ve idrarda bulunur. Endojen peroksizom proliferatör aktifleştirici reseptör ligand olarak görev yapmakta olduğu ve ayrıca, antioksidan ve antikarsinogenik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Syeda vd. 2011; Hema vd. 2011). Ayrıca, bu bileşikten türetilen bileşikler antibiyotiklerin sentezini modüle etmede kullanılan önemli elementlerdir. Octadecanoic acid methyl ester bileşiğinin düşük pH'da potansiyel antifungal, antimikrobiyal ve antibakteriyeldir (Gehan vd. 2009).

Hentriacontane bileşiğinin mantar sporlarının çimlenmesine karşı antifungal, antioksidan, antitümör ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Atolani vd. 2009).

5.4. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

G. sphaerocephala türünün su ve metanol ekstraktlarının anti-proliferatif kapasiteleri XTT metodu kullanılarak HT-29 (kolorektal adenokarsinoma), HepG2 (hepatoselüler karsinoma) ve MCF-7 (meme adenokarsinoma) hücre hatları üzerinden değerlendirildi.

Apoptoz (programlı hücre ölümü) mekanizmasında ana rolleri, ölüm reseptörleri, adaptör proteinler, ve proteolitik enzimler (kaspazlar) oynamaktadır (Hetts, 1998).

Ölüm reseptörleri, Tumour Necrosis Factor (TNF) reseptör gen familyasındandır ve adaptör proteinlere bağlanarak dışarıdan gelen ölüm sinyallerini hücre içine iletirler (Büyükgebiz ve Caferler, 2001). CD95 (APO-1/Fas), TRAIL-R1 (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand), TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 ölüm reseptörlerine örnek olarak verilebilir (Eichhorts ve Krammer, 2001). Ölüm reseptörlerinden gelen sinyal sonrası adaptör proteinler devreye girerek kaspazlara bağlanıp onları aktif hale getirirler. REL proteinleri, WNT1, β -Catenin, Fas, CD95 Adaptör proteinlere örnek olarak verilebilir. Nihayetinde, bu adaptör proteinlerin etkisiyle kaspaz dizisi aktifleşir.

Kaspazlar; "başlatıcılar" (kaspaz 2,8,10) ve "uygulayıcılar" (kaspaz 3,6,7) olmak üzere iki sınıftırlar (Budihardjo ve Oliver, 1999). Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar adaptöre bağlanırlar ve uygulayıcı kaspazları aktif ederler. Ölümü gerçekleştiren, uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Nihayetinde, sonuçta aktif hale gelen DNAaz enzimi DNA yıkımına sebep olur (Büyükgebiz ve Caferler, 2001).

48 saat inkübasyon süresinden sonra, bitki ekstralarının hücre proliferasyon inhibisyon yüzdeleri Şekil 4.18 ve 4.19'da gösterilmektedir. Ayrıca, bitki ekstralarının ve pozitif referans ilaç 5-FU'nun IC₅₀ değerleri Tablo 4.8'de sergilenmektedir. Şekil 4.18 ve 4.19'da gösterildiği gibi test edilen hücre hatlarının proliferasyonları, bitki ekstraları tarafından önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Su ve metanol ekstralarının inhibisyon yüzdeleri maksimum konsantrasyonda (1 mg/mL), HepG2 hücrelerine karşı % 48 ve % 91, HT-29 hücrelerine karşı % 40 ve % 79 ve MCF-7 hücrelerine karşı % 41 ve % 67 dir. Öte yandan 5-FU'nun aynı konsantrasyonda mevcut hücre hatları üzerindeki proliferasyon inhibisyonları sırasıyla % 95.2, % 96.3 ve % 93.1 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8 dikkate alınarak antikanser faaliyetleri karşılaştırıldığında, metanol ekstraktı test edilen hücre hatlarına karşı su ekstraktından daha yüksek inhibisyon aktivitesi sergilediği gözlenmektedir. Metanol ekstraktının HepG2, HT-29 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.26, 0.46 ve 0.73 mg/mL iken su ekstraktının IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 1.12, 1.19 ve 1.30 mg/mL'dir. Tablo 3 te görüldüğü gibi her iki ekstrede test edilen tüm hücre hatlarına karşı pozitif kontrole göre ılımlı antikanser aktivite gösterdi. IC₅₀ değerleri göz önüne alındığında, bitkinin metanol ekstresinin HepG2 hücrelerine karşı daha yüksek oranda antiproliferatif aktivite sergilediği gözükmemektedir. Bunun sebebi, metanol ekstresi'nin, HepG2 hücrelerinin ölüm reseptörleri ile daha fazla sinyal bağı kurarak onları uyarmakta daha etkili olması olabilir.

Elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle de uyumludur. Naghibi vd. üç *Gypsophila* türünün metanol ekstresinin sitotoksik aktivitelerini incelendiği bir çalışmada HepG2, HT-29, MCF-7 hücrelerinin yanı sıra A549 (akciğer kanser hücre hattı) ve MDBK (ortanca sığıır böbrek) hücreleri üzerinde çok yüksek antiproliferatif aktivite sergilemediklerini rapor etmişlerdir (Naghibi vd., 2014). Bir diğer çalışmada ise bir başka *Gypsophila* türünün metanol ekstresi 0.1mg/mL konsantrasyonda MCF-7, HCT-116, HepG2 ve A549 kılcal hücrelerin proliferasyonunu sırasıyla %32.5, %10.3, %24 ve

%10.8 inhibe ettiği bildirildi (Moustafa vd., 2014). Başka bir çalışmada da *Gypsophila trichotoma* 'nın metanol ekstresi 0.1 mg/mL konsantrasyonda BV-173 lösemi hücre proliferasyonunu % 2.2 inhibe ettiği bildirildi (Voutquenne-Nazabadioko vd., 2013).

Sonuç olarak, bu çalışmada endemik bir bitki türü olan *Gypsophila sphaerocephala* ' nın su ve metanol ekstrelerinin fenolik madde içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve antiproliferatif kapasiteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Ayrıca, hegzan ekstresi üzerinden bitkinin esansiyel yağ içeriği kalitatif olarak belirlendi. Toplam fenolik ve flavonoid içerik testlerinde ve HPLC analizleri sonucunda, bitkinin metanol ekstresinin su ekstresine kıyasla daha yüksek oranda fenolik madde içerdiği belirlendi. Ayrıca, GC-MS analizleri neticesinde bitkinin esansiyel yağ içeriği açısından oldukça zengin olduğu belirlendi. En bol bulunan yapıların ise Hentriacontane (%16.87), Monanoicacid (%10.45), Tetratriacontane (%5.06) olduğu tespit edildi. Ekstrelerin antioksidan kapasiteleri dört farklı metod üzerinden değerlendirildi. Uygulanan antioksidan aktivite testler neticesinde, metanol ekstresinin antioksidan aktivitesinin su ekstresine kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi. Benzer şekilde XTT metoduyla üç farklı hücre hattı üzerinden değerlendirilen antiproliferatif çalışmalarında, metanol ekstresinin su ekstresine kıyasla daha yüksek aktivite sergilediği gözlendi. Öte yandan her iki ekstreninde referans antioksidan bileşikler (tokferol, troloks, BHT ve BHA) ve pozitif kemoterapötik ilaç (5-FU) ile kıyaslandıklarında orta derecede biyolojik aktivite sergilediği belirlendi.

KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Jhon, R., Sarwat, M., and Umar, S. (2008) "Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress", *International Journal of Plant Production*, 2(4), 353-365.
- Akdulum, B. (2011) "*Echinacea pallida*'nın köklerindeki bileşiklerin izolasyonu, yapı tayini ve antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, 1-2.
- Akkuş, İ. (1995) "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", *Mimoza Yayınları*, Konya, 106-111.
- Aksoy, Y. (2002) "Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü", *Klinik Tıp Bilimleri*, 22, 442-448.
- Aksoy, M. (2016) "Bazı flavonoidlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon s-transferaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi", Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 9 -10.
- Alpınar, K. ve Saçlı, S. (1997) "Türkiye'deki Etnobotanik Çalışmalar Hakkında Bir Bibliyografya", *XI. BİHAT Bildiriler Kitabı*, Ankara, 157-167.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993) "Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
- Anıl, M. (2006) "Antioksidan olarak tahıllar", *Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, 7-8 Eylül, Gaziantep.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004) "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Arslan, I., and Çelik A. (2013) "Saponin rich fractions (SRPs) from Soapwort show antioxidant and hemolytic activity". *APCBEE Procedia*, 7, 103-108.
- Aslan, G. (2010) "Tümör immünolojisi", *Turkish Journal of Immunology*, 15, 7-13.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006) "Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Baytop, T. (1999) "Türkiye'de Bitkilerle Tedavi", *Nobel Tıp Kitabevleri*, 2. Baskı, İstanbul.

- Blois M.S. (1958) "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical" **Nature**, 181, 1199–1200.
- Bozarı S. (2012) "Lamiaceae Familyasına Ait Farklı Türlerden Elde Edilen Allelopatik Potansiyele Sahip Esansiyel Yağların Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi", Doktora Tezi, **Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum 1-35.
- Bozkurt, Y., ve Göker Y. (1981) "Orman Ürünlerinden Faydalanma", **İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları**, İ.Ü. Yayın No 2840, O.F. Yayın No 297.
- Breitmaier, E. (2006) "Terpenes. Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones", **Wiley-VCH, Weinheim**, Germany, 220.
- Budihardjo, I., Oliver, and H.L.M. (1999) "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis", **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 15, 269-290.
- Buettner, G.R., and Jurkiewicz, B.A. (1996) "Catalytic, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid", **Radiation Research**, 145(5), 532-541.
- Burton, G.W. (1989) "Antioxidant action of carotenoids", **Journal of Nutrition**, 119, 109-111.
- Büyükgebiz, O. and Caferler, J.S. (2001) "Apoptosis", **Sendrom**, 13(1), 102-107.
- Chima, N.K., Nahar L., Majinda, R.R.T., Celik, S., and Sarker, S.D. (2014) "Assessment of free-radical scavenging activity of *Gypsophila pilulifera*: assay-guided isolation of verbascoside as the main active component". **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 24, 38–43.
- Coşkun, F. (2006) "Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular", **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 2, 27-33.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G (2000) "Natural products (secondary metabolites), in Biochemistry and Molecular Biology of Plants", **American Society of Plant Biologists**, Rockville, MD, USA, pp. 1250–1268.
- Davies, K.J.A. (2000) "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems", **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, 50, 279-289.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., and Almeida, L.M. (1994) "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxyl radical scavengers", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 315 (1), 161-169.
- Donaldson, W.E. (1994) "Nutritional factors", **Introduction a Biochemical Toxicology, Second Edition**, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut.

- Draper, H.H. (1990) "Nutritional modulation of oxygen radical pathology", ***Advances in Nutritional Research, Plenum Press***, New York, 119-145.
- Dubey, V.S. (2003) 'Bhalla, R. and Luthra, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants', ***Journal of Biosciences***, 28, 637–646.
- Eichhorst, S.T. and Krammer P.H. (2001) "Derangement of apoptosis in cancer", ***The Lancet***, 358, 345-346.
- Embuscado, M.E. (2015). "Spices and herbs: natural sources of antioxidants— a mini review", ***Journal of Functional Foods***, 18, 811–819.
- Evelson, P. and Ordonez, C.P. (1997) "Oxidative stress", ***Photochemistry Photobiology***, 38(2-3), 215-219.
- Feredoon, S. and Janitha, P.K. (1992) Wanasundara, P.D., "Phenolic Antioxidants", ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 32(1), 67-103.
- Formica, J.V. and Regelson, W. (1995) "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids", ***Food and Chemical Toxicology***, 33(12), 1061-1080.
- Frankel, E.N. (1980) "Lipid oxidation, A review", ***Progress in Lipid Research***, 19, 1-22.
- Freedman, B., Kwolek, W. F., Pryde, E. H. (1986) "Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography 1", ***Journal of the American Oil Chemist's Society***, 63(10), 1370-1375.
- Fridovich, I. (1989) "Superoxide Dismutases - an Adaptation to a Paramagnetic Gas." ***Journal of Biological Chemistry***, 264(14): 7761-7764.
- Gaetani, G., Ferraris, A., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., and Kirkman, H. (1996) "Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes", ***Blood Journal***, 87(4), 1595-1599.
- Gerald F. and Combs, Jr., James, P., McClung, Ph.D. (2017) "***The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health***" 612, 117.
- Gezgin, D. (2006) "Bitki Mitosları", ***Sel Yayıncılık***, İstanbul.
- Gök, V. ve Serteser, A. (2003) "Doğal antioksidanların biyoyararlılığı", ***3. Gıda Mühendisliği Kongresi***, 2-4 Ekim, Ankara.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., and Durmaz, Y. (2006) "Algal antioksidanlar", ***Journal of Fisheries and Aquatic Sciences***, 23, 85-89.
- Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L. and Leach, D.N. (1999) "The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity", ***Flavour Fragrance Journal***, 14, 322–332.

- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., and Küfrevioğlu, Ö.İ. (2003) "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts", *Food Chemistry*, 83, 371-382.
- Gülçin, İ. (2012) "Antioxidant activity of food constituents: an overview", *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Halfon, B. (2005) "Natural Products Lecture Notes", *Boğaziçi University Press*, İstanbul.
- Halliwell, B., and Gutteridge J.M.C. (1989) "Free Radicals in Biology and Medicine" *Clarendon Press*, Oxford, 543.
- Halliwell, B. (1990). "How to characterise a biological antioxidant", *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
- Halliwell, B. (1996) "Oxidative stress, nutrition and health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans", *Free Radical Research*, 25, 57-74.
- Halliwell, B., and Gutteridge J.M.C. (1999) "Free Radicals in Biology and Medicine", 3rd ed., *Oxford University Press*, New York, 246-351.
- Henrikson, J. (1992) "Cellular Metabolism and Endurance, Endurance in Sport", Editors Shephard RJ, Astrand PO, *Blackwell Science*, London.
- Hetts, S.W. (1998) "To die or not to die", *The Journal of The American Medical Association (JAMA)*, 279, 300-307.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hossein, A., and Arman. İ. (2015) "The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*", *International Journal of Clinical Medicine*, 6, 635-642 .
- Huang, M.T., Smart, R.C., Wong, C.Q., and Conney, A.H. (1988) "Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate", *Cancer Research*, 48, 5941-5946.
- Hussain, A. I., (2009) "Characterization and Biological Activities of Essential Oils of Some Species of Lamiaceae." PhD, *University of Agriculture, Department of Chemistry*, Pakistan ,10-35.
- Jialal, I., and Grundy SM, (1993) "Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation", *Circulation*. 88: 2780-2786.
- Keszei, A., Brubaker, C.L. and Foley, W.J. (2008). "A molecular perspective on terpene variation in Australian", *Myrtaceae Australian Journal of Botany*, 1-200.
- Koçyiğit, M. (2005) "Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.

- Kopsell, D.A. and Kopsell, D.E. (2006). "Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops". *Trends In Plant Sciences*, 11; 499-507.
- Korukluoğlu, M., İrkin R., and Sertel S. (2006) "Salmonella ve Shigella Türlerinin gelişmesini engelleyen tıbbi bitkiler ve Esansiyel yağlar", *Gıda Dergisi*, 31(6), 319-324 .
- Köksal, E. (2007). "Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi", Doktora Tezi", *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, 1-50.
- Krinsky, N.I. and Deneke, S.M. (1982) "Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids", *Journal of the National Cancer Institute*, 69, 205–209.
- Kwee, J.K., Mitidien, E., and Alfonso, O.R. (1991) "Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B 16 melanoma cells", *Cancer Letters*, 57, 199-202.
- Michalak, A. (2006) "Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress", *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
- Mitchel, R.E.J., and Mccann, R., (1993) "Vitamin E is a complete tumor promotor in mouse skin", *Carcinogenesis*, 14(4), 659-662.
- Moustafa, S.M., Menshawi, B.M., Wassel, G.M., Mahmoud K., and Mounier, M. (2014) "Screening of some plants in egypt for their cytotoxicity against four human cancer cell lines", *International Journal Pharmtech Research*, 6, 1074–1084.
- Naghibi, F., Irani, M., Hassanpour, A., Pirani, A., and Hamzeloo- Moghadam, M. (2014) "Cytotoxic effects of selective species of Caryophyllaceae in Iran", *Research Journal of Pharmacognosy*, 1, 29–32.
- Obst, J.R. (1998) "Special (secondary) metabolites from wood, in Forest Products Biotechnology", *Taylor & Francis*, London, pp. 151–165.
- Packer, L. (1991) "Protective role of vitamin E", *Clinical Nutrition*, 53, 1050-1055.
- Paolini, M., Cantelli-Forti, G., Perocco, P., Pedulli, G.F., Abdel-Rahman, S.Z. and Legator, M.S. (1999) "Co-carcinogenic effect of β -carotene" *Nature*, 398; 760-761.
- Paquat, C., and Hautfenne, A. (1992) "International Union of Pure and Applied Chemistry", *Blackwell Scientific Publications*, London.1-50.
- Pietta, P.G. (2000) "Flavonoids as antioxidants", *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

- Quintanilha, A.T.L., Packer, J.M.S., Davies, T.L., and Racanelli, K.J.A. (1982) "Membrane Effects of Vitamin-E-Deficiency - Bioenergetic and Surface-Charge Density Studies of Skeletal-Muscle and Liver-Mitochondria." ***Annals of the New York Academy of Sciences***, 393, 32-47.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., and Kumar, M.N.V.R. (2006). "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective", ***Journal of Controlled Release***, 113, 189-207.
- Re, R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", ***Free Radical Biology and Medicine***, 1231-1237.
- Richard, A. D. (2011) "Plant biotechnology shapes up for the 21st century", ***Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation***, OK, USA 1, 3-6.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Zanden, J.J., Woude, H., Alnk, G.M., and Koeman, J.H. (2002) "The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids", ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, 11, 321-333.
- Saldamlı, İ. (2007) "Gıda Kimyası", ***Hacettepe Üniversitesi Yayınları***, Ankara, 463-492.
- Sen, S., and Chakraborty, R. (2011) "The role of antioxidants in human health, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy", ***Chapter 1***, 1-5.
- Serteser, A., Kargioğlu, M., Gök, V., Bağcı, Y., Özcan, M.M., and Arslan, D. (2009) "Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey", ***Grasas Aceites***, 60, 147-154.
- Shahidi, F., and Naczk, M. (1995) "Food Phenolics", ***Technomic Publishing Company Book***, Lancaster, USA, 199-225.
- Shahidi, F. (1996). "Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications", ***AOCS Press, Champaign, Illinois***, 0-935315-77-2.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents", ***American Journal of Enology and Viticulture***, 16, 3 144- 158.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., and Sochor J. (2015). "Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries" ***International Journal of Molecular Science***, 16, 24673-24706.
- Sroka, Z., and Cisowski, W. (2003) "Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids", ***Food and Chemical Toxicology***, 41 753-758.

- Stadtman, E.R. (2002) "Importance of individuality in oxidative stress and aging", **Free Radical Biology and Medicine**, 33, 597-604.
- Stevenson, D.E., and Hurst, R.D. (2007) "Polyphenolic phytochemicals just antioxidants or much more", **Cellular and Molecular Life Sciences**, 64, 2900-2916.
- Şit, L. (2011) "Çeşitli bitkilerin antioksidan özelliklerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Edirne.
- Thormar, H. (2011). "Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agent" **A John Wiley and Sons, Ltd., Publication**, 205-220
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., and Arzani, A. (2017) "Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran" **Food Chemistry**, 220, 153–161.
- Turan, F.A. (2000) "Türkiye’de Halk İlacı Araştırmaları", **T.C. Kültür Bakanlığı**, Ankara.
- Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L., and Simic S.G. (2014) "Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants", **Central European Journal of Biology**, 9, 888–900.
- Van-Der Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J., and Faulkner, J.A. (1997) "The rol of vitamin E", **Journal Applied Physiology**, 83, 817-823.
- Vining, L.C. (1990) "Functions of secondary metabolites", **Annual Review of Microbiology**, 44, 395-427.
- Vitcheva, V., Simeonova, R., Krasteva, I.M., Yotova, S., and Mitcheva, M. (2011). "Hepatoprotective effects of saponarin, isolated from *Gypsophila trichotoma* Wend. on cocaine-induced oxidative stress in rats", **Redox Report**, 16, 56–61.
- Voutquenne-Nazabadioko, L., Gevrenova, R., Borie, N., Harakat, D., Sayagh, C., Weng, A., Thakur, M., Zaharieva, M., and Henry, M. (2013). Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender. **Phytochemistry**, 90, 114–127.
- Wargovich, M.J., Jimenez, A., and McKee, K. (2000) "Abnormal crypt formation in rat colon of potential chemopreventive agents and their effect on progression", **Carcinogenesis**, 21, 1149-1155.
- Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, N.H., and Williamson, G.B. (1993) "Just how insoluble are monoterpenes?" **Journal of Chemical Ecology**, 19, 1799–1807.
- Yazici, S.Ö., and Özmen İ. (2017). "Effect of the crude saponin Extract from *Gypsophila pilulifera* Boiss. & Heldr. on protease from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and antioxidant properties of the extract", **Iranian Journal of Science and Technology**, 42, 1707-1713.

Zhao, G.R., Xiang, Z.J., Ye, T.X., Yuan, Y.J., and Guo, Z.X. (2006) “Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*”, *Food Chemistry*, 99, 767-774.

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

Zintzen, H. (1997) “Fat-soluble vitamins in nutrition of ruminants”, *La Roche*, Basel.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kayseri-Develi’ de doğdu. İlköğretimi Balıkesir-Burhaniye’de, ortaöğretimi Antakya’da, lise öğrenimini Konya’da tamamladı. 2010 yılında Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi MYO Gıda Teknolojisi Bölümü’nden, 2014 yılında Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden mezun oldu. Aynı yıl Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.

